

Adenovirusinfektionen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation im Kindesalter

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Elisa Caroline Thomas, geb. Pape
geboren am 06.08.1990 in Halle an der Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Bernd Gruhn, Jena
2. PD Dr. Sebastian Scholl, Jena
3. Prof. Dr. Ingo Müller, Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08.01.2018

**Meinem unerschütterlichen Fels in der Brandung - Basti, meiner Familie und allen
Kindern, die diesen Weg meistern müssen**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AdV	Adenoviren
AdVE	Adenoviruserkrankung
ATG	Antithymozytenglobulin
ELISA	Enzyme Linked Immonosorbent Assay
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
GVHD	Graft-Versus-Host-Reaktion englisch <i>graft-versus-host-desease</i>
GVL	Graft-Versus-Leukemia-Effekt
HAdV	humaner Adenovirus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
KOF	Körperoberfläche
KM	Knochenmark
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex, englisch <i>Major Histocompatibility Complex</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PUVA	Photochemotherapie aus Psoloralen + UV-A
Tab.	Tabelle

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Inhaltsverzeichnis.....	5
1 Zusammenfassung.....	8
2 Einleitung	10
2.1 Geschichte	10
2.2 Grundlagen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation	12
2.2.1 Die Stammzellen	12
2.2.2 Das HLA-System	13
2.2.3 Transplantationsarten	14
2.2.4 Die Konditionierung.....	16
2.2.5 Die hämatologische und immunologische Rekonstitution.....	17
2.3 Komplikationen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	18
2.3.1 Transplantatabstoßung	18
2.3.2 Graft-Versus-Host Krankheit	19
2.3.3 Infektionen	21
2.4 Adenoviren	23
2.4.1 Charakterisierung	23
2.4.2 Krankheitsverlauf.....	24

2.4.3	Diagnostik und Therapie	25
3	Ziele der Arbeit	26
4	Patienten, Materialien und Methoden	27
4.1	Patienten	27
4.1.1	Patientencharakteristik	27
4.2	Ablauf der Stammzelltransplantation	31
4.2.1	Transplantationszeitpunkt	31
4.2.2	Vorbereitung der Transplantation	32
4.2.3	Konditionierung	33
4.2.4	Prophylaxe der Graft-Versus-Host-Krankheit	34
4.3	Nachweis von Adenoviren	35
4.3.1	Klinische Proben	35
4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion	35
4.3.3	Agarose-Gelelektrophorese der viralen Desoxyribonucleinsäure	39
4.3.4	Nachweis von Adenoviren durch Enzymimmunoassay Ridacreen ®	40
4.4	Statistische Methoden	42
5	Ergebnisse	44
5.1	Merkmale einer Adenovirusinfektion	44
5.2	Einfluss des Alters und des Geschlechts	53
5.3	Einfluss der Transplantationsart	55
5.4	Einfluss der Konditionierung	61
5.5	Einfluss der Graft-Versus-Host-Krankheit	63
5.6	Einfluss der Therapie	68
5.7	Exemplarischer Patientenverlauf	70
6	Diskussion	72
6.1	Allgemeines	72
6.2	Adenovirusreaktivierungen und ihre Häufigkeiten	72
6.3	Letalität von Adenovirusinfektionen	74

6.4	Risikofaktoren und deren Einfluss auf Reaktivierung und Letalität	75
6.4.1	Signifikante Risikofaktoren für Adenovirusinfektion.....	75
6.4.2	Nicht signifikante Risikofaktoren für Adenoviren.....	77
6.5	Einfluss der Therapie auf die Letalität	78
7	Schlussfolgerung	80
8	Literaturverzeichnis.....	81
9	Anhang	93
9.1	Tabellenverzeichnis.....	93
9.2	Abbildungsverzeichnis	94
9.3	Lebenslauf	95
9.4	Danksagung	96
9.5	Ehrenwörtliche Erklärung	97

1 Zusammenfassung

Adenovirusinfektionen sind häufige Komplikationen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) bei Kindern, welche mit hoher Morbidität und Letalität einhergehen. Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist in den meisten Fällen eine Reaktivierung der Adenoviren (AdV) und nur sehr selten eine Neuinfektion. AdV-Infektionen weisen ein großes Spektrum der Krankheitsschwere auf; sie können symptomlos verlaufen oder mit Symptomen wie Gastroenteritis, Konjunktivitis, Atemwegserkrankungen, Harnwegsinfekte oder Hepatitis einhergehen. Breitet sich das Virus im gesamten Organismus aus, spricht man von einer disseminierten oder generalisierten AdV-Infektion, welche durch ein extrem hohes Risiko zu versterben gekennzeichnet ist. In der vorliegenden Arbeit wurde retrospektiv ein Patientenkollektiv analysiert, welches 262 Kinder umfasst, die von 01/1999 bis 10/2011 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena eine HSZT erhielten. Der Nachweis der AdV erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) oder durch den Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, wie viele Kinder von der AdV-Infektion betroffen sind, ob sie bestimmte Risikofaktoren gemeinsam haben und wann und wodurch aus einer milden Adenoviruserkrankung (AdVE) ein generalisierter Krankheitsverlauf mit disseminiertem Adenovirusnachweis wird. Als mögliche Risikofaktoren wurden Alter, Geschlecht, Transplantationsart, Spendertyp, Art der Stammzellquelle, Konditionierungsregime und Einfluss einer Graft-Versus-Host-Reaktion engl. *graft-versus-host-disease* (GVHD) untersucht und statistisch ausgewertet nach Vorhandensein einer AdV-Infektion und deren Letalität. Bei Patienten mit AdV-Infektion wurde die durchgeführte Therapie ermittelt und der Zeitraum vom ersten positiven Adenovirusnachweis bis zur ersten Gabe von Virustatika erfasst. Mittels dem Chi-Quadrat-Test und der Kaplan-Meyer-Überlebenszeitanalyse konnten signifikante und nicht signifikante Ergebnisse erzielt werden.

Von 262 Kindern nach HSZT erkrankten 28 Kinder an einer AdV-Infektion (10,7 %). Von diesen 28 Kindern mit positivem AdV-Nachweis trat bei 10 Kindern eine disseminierte AdV-Infektion auf (35,7 %). 7 der 28 Kinder verstarben an der AdV-Infektion. Patienten mit AdV

versterben insgesamt signifikant häufiger ($p = 0,006$). Verläuft die AdV-Infektion disseminiert ist das Risiko zu versterben signifikant erhöht ($p = 0,023$), die Letalität liegt in diesem Fall bei 50 % (5 von 10 Patienten) im Vergleich zur lokalisierten Erkrankung, bei der die Letalität 11,1 % beträgt (2 von 18 Patienten). Risikofaktoren für AdV sind die Transplantationsart und das Auftreten einer schweren GVHD. Patienten, welche allogent transplantiert worden sind, haben ein signifikant höheres Risiko für eine Adenovirusreaktivierung (13,4 % bei allogener HSZT und 4,8% bei autologer HSZT, $p = 0,036$). Patienten mit schwerer GVHD (Grad III und IV) infizieren sich häufiger mit AdV ($p = 0,018$) und entwickeln gleichzeitig auch signifikant häufiger einen disseminierten Verlauf der Infektion ($p = 0,015$). Das Überleben von Patienten mit disseminierter Erkrankung unterscheidet sich signifikant je nach Therapie mit oder ohne Cidofovir (Überlebenswahrscheinlichkeit mit Cidofovir 50% vs. 0 % ohne Cidofovir, $p = 0,01$). Die Gabe von adenovirusspezifischen Spender-T-Lymphozyten stellt eine in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigte Therapiemöglichkeit dar, deren weitere Erforschung und Einbeziehung in den Therapiealltag wichtig ist. AdV-Infektionen als gefährliche Komplikation nach HSZT sollten beim Behandeln der betroffenen Kinder stets auch im Zentrum der Aufmerksamkeit sein. So hilft beispielsweise ein wöchentliches Screening auf AdV, AdV-Infektionen aufzudecken und rasch zu behandeln, um einen disseminierten und damit oft letalen Verlauf abzuwenden.

2 Einleitung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) erlangt als noch relativ junge Methode der Medizin immer größere Bedeutung bei der Behandlung hämatologischer, onkologischer, immunologischer und genetischer Erkrankungen. In vielen Fällen stellt sie die letzte kurative Therapieoption lebensbedrohlicher Erkrankungen dar, wobei die Chance auf Heilung mit dem Risiko zahlreicher Nebenwirkungen und Komplikationen behaftet ist. Das Risikoprofil gestaltet sich individuell, abhängig von der Art des Transplantats, der gewählten Konditionierung im Vorfeld der Transplantation und dem Gesundheitszustand vor und nach der Transplantation. Zu den gefürchtetsten Komplikationen zählen immunologische Reaktionen bis hin zur Abstoßung, Toxizität durch die Konditionierung und Infektionen in der Phase der nicht vorhandenen eigenen Immunabwehr und langsamen Rekonstitution des Spenderknochenmarks. In der vorliegenden Arbeit wird vor allem die Reaktivierung durch den humanen Adenovirus (HAdV) in einer Patientengruppe des Universitätsklinikums Jena von 1999 bis 2012 untersucht. Die Erforschung von Risikofaktoren und das Vorgehen im Falle der Reaktivierung sind wichtige Voraussetzung, um die Prophylaxe und Therapie dieser Patienten zu optimieren und die Mortalität zu senken.

2.1 Geschichte

Die Idee, durch Infusion von Blut oder Knochenmark Krankheiten zu heilen oder neue Kräfte zu erwerben, besteht seit der Antike als Teil der Mythologie (Bartsch und Mertelsmann 1996). Konkrete Denkanstöße zur Umsetzung folgten in der Zeit nach dem zweiten Weltkrieg, da das Interesse an den biologischen Effekten der Strahlenwirkung immens war, auch aus Angst vor einem Atomkrieg. Die Forschung entdeckte, dass Knochenmark das strahlenempfindlichste Organ ist und schon bei geringer Strahlendosis ein Versagen mit Todesfolge eintreten kann (Thomas und Blume 1999). Lorenz et al. konnten 1951 zeigen, dass Mäuse, die einer sonst tödlichen Strahlendosis ausgesetzt worden waren, durch eine Infusion von Knochenmark oder Milzzellen überleben konnten (Lorenz et al. 1951). Sie bauten eine spenderspezifische

Immuntoleranz auf, die es ihnen ermöglichte Hauttransplantate der Spendermaus zu akzeptieren (Main und Prehn 1955). Allerdings machte die Arbeitsgruppe um Lorenz hormonelle oder humorale Faktoren für das Nachwachsen des Knochenmarks verantwortlich (Thomas und Blume 1999). Weitere Forschung brachte die Erkenntnis, dass lebendige Zellen des Spenders im Empfänger weiterleben, sodass Spender und Empfänger später die gleichen zytogenetischen Merkmale aufweisen (Ford et al. 1956). Im Jahr 1959 transplantierten Thomas et al. erstmalig zwei Patienten mit fortgeschrittener Leukämie durch Bestrahlung und anschließender Stammzellspende ihres identischen Zwillings. Sie erlitten zwar einige Monate später ein Rezidiv der Leukämie, dennoch war die erste bewusste supraletale Bestrahlung und HSZT geglückt (Thomas et al. 1959). Mannick et al. verabreichten einem Hund, nach einer supravitalen Strahlendosis, Stammzellen und führten so 1959 erstmals eine allogene HSZT mit nachfolgender Nierentransplantation durch. Der Hund verstarb 73 Tage nach der Bestrahlung und 49 Tage nach dem Nierentransplantat an einer Pneumonie ohne Abstoßungsreaktionen eines der beiden Transplantate (Mannick et al. 1959). Dies stellte gleichzeitig das Potenzial der neuen Methode unter Beweis, zeigte aber auch Gefahren und Risiken einer HSZT auf. Mit Aufkommen der Immunsuppressiva wurde die Idee, einer Indikation der HSZT mit dem Ziel nachfolgend Organe zu transplantieren, fallen gelassen.

Bellingham und Brent entdeckten die Immunreaktion von Spenderzellen gegen den Empfänger, heute als GVHD bekannt und Uphoff zeigte, dass diese durch genetische Faktoren beeinflussbar war und durch die Behandlung mit Methotrexat eine Verbesserung eintrat (Bellingham und Brent 1959, Uphoff 1957, Uphoff 1958).

Einen beachtlichen Fortschritt in der Stammzellforschung erzielten die Ergebnisse des französischen Onkologen Georges Mathé. 1963 führte er die erste allogene HSZT an einem Leukämiepatienten durch, ohne dass die Stammzellen von einem identischen Zwilling stammten. Der Patient verstarb Monate später an den Komplikationen der Transplantation, doch Mathés Forschung legte den Grundstein, Leukämie mit Hilfe von HSZT zu heilen (Mathe et al. 1965). Bis 1967 folgten Jahre intensiver Forschung, in denen Fortschritte bei allogenen HSZT bei Tieren zu verzeichnen waren, die Ergebnisse am Menschen jedoch pessimistisch stimmten (Thomas und Blume 1999). Der Durchbruch gelang schließlich mit der Entdeckung des humanen Leukozyten-Antigen- (HLA) Systems und dem Nutzen dieser Erkenntnis für die HSZT (van ROOD et al. 1958). Das HLA-System ermöglichte die Auswahl der Geschwister mit identischen HLA-Antigenen oder auch Transplantationsgenen (Gatti et al. 1968). Die treibende Kraft dieser Entwicklung war vor allem der Forscher E. Donnall Thomas, der sich mit seinem Team in Seattle seit Ende der 50er Jahre intensiv diesem Gebiet widmete. Er machte

die HSZT klinisch durchführbar und entwickelte durch zahlreiche Studien, hauptsächlich an Hunden, die Kunst, GVHD und Immunsuppression zu balancieren. 1990 erhielt er für seine Errungenschaften den Nobelpreis der Medizin und Physiologie (Blume und Weissman 2012).

2.2 Grundlagen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Unter einer HSZT versteht man die Übertragung von hämatopoetischen Blutstammzellen von einem Spender zu einem Empfänger mit dem Ziel, ein defektes oder maligne entartetes lymphohämatopoetisches System durch ein gesundes Spendersystem zu ersetzen. In den letzten Jahren ist der klassische Terminus der Knochenmarktransplantation überwiegend dem Begriff der HSZT gewichen, da er alle drei Möglichkeiten der Stammzellgewinnung einschließt: die Knochenmarktransplantation, die periphere Blutstammzelltransplantation und die Nabelschnurbluttransfusion (Ebell 2006). War es in den Anfängen noch gängig, das Knochenmark direkt meist aus dem Becken zu gewinnen und komplett zu transplantieren, werden heute vor allem periphere Blutstammzellen gesammelt und z.T. nach Zelltypen aufbereitet (Cutler und Antin 2001).

Prinzipiell werden bei der HSZT gesunde hämatopoetische Stammzellen von einem Spender auf einen Empfänger übertragen. Beim Patienten, dem Empfänger der Stammzellspende, regeneriert sich beim erfolgreichen Anwachsen des Transplantats die Hämatopoese aus den Zellen des Transplantats und auch das Immunsystem baut sich teilweise oder ganz aus den Spenderstammzellen auf.

2.2.1 Die Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen sind kleine mononukleäre Zellen, die im Knochenmark eine lebenslange Bildung neuer Blutzellen aller Zelllinien gewährleisten. Sie besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und sich asymmetrisch in eine ausdifferenzierte und eine primitive hämatopoetische Stammzelle zu teilen. Stammzellen befinden sich im Knochenmark in unmittelbarer Nähe der Knochenmarkstromazellen wie Osteoblasten, Knochenmark-fibroblasten, CXCL-12-reiche retikuläre CAR-Zellen und Knochenmarkmakrophagen in der sog. Stammzellnische. Diese unterdrückt über lösliche und oberflächengebundene Faktoren die Ausdifferenzierung der Stammzellen und sorgt so für eine lebenslange weitgehend konstante Zahl der Stammzellen. Andererseits bestimmt die Stammzellnische auch den Proliferationsweg der hämatopoetischen Stammzellen (Bönig et al. 2011, Papayannopoulou und Scadden 2008).

Die hämatopoetischen Stammzellen müssen aus dem Knochenmark mobilisiert werden, damit eine für die Transplantation ausreichend große Anzahl aus dem zirkulierenden Blut für die Transplantation gewonnen werden kann. Dies kann durch Zytostatika in Kombination mit Wachstumsfaktoren erfolgen. Als Wachstumsfaktor wird meist der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor verwendet. Bei einer autologen Transplantation können, insofern eine maligne Grunderkrankung vorliegt, die verabreichten Chemotherapeutika auch als Stimulus für die Mobilisation von Stammzellen genutzt und mit Wachstumsfaktoren kombiniert werden. Bei einer allogenen Transplantation wird für den Spender der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor verwendet. Sowohl der Grad der durch die Zytostatika verursachten Myelosuppression als auch die Dosis des verabreichten Wachstumsfaktors korrelieren direkt mit der Anzahl der mobilisierten Stammzellen (To et al. 1984, Schwartzberg et al. 1992).

Die Quantifizierung der zu transplantierenden Zellen erfolgt über das CD34-Antigen, welches alle hämatopoetischen Stammzellen phänotypisch exprimieren. Für eine erfolgreiche Therapie sollten mindestens 1×10^6 CD34+-Zellen pro Kilogramm Körpergewicht transplantiert werden. Höhere Stammzelldosen im Transplantat verringern das Risiko eines Therapieversagens bei HLA-identischen Geschwistertransplantationen. Das Optimum, der zu transplantierenden Menge, beträgt $> 3 \times 10^6/\text{kg}$ Körpergewicht für Knochenmark und $> 6 \times 10^6/\text{kg}$ Körpergewicht für periphere Blutstammzellen (Ringden et al. 2003).

2.2.2 Das HLA-System

Ein zentraler Faktor zur Gewebeverträglichkeit und somit zum Erfolg einer Transplantation ist der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). Dieser wird beim Menschen als HLA bezeichnet und beinhaltet Gene, welche für Proteine zur Antigenpräsentation, Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen und zur immunologischen Individualität wichtig sind (Ljunggren und Kärre 1990). Das MHC- System besteht aus 2 Klassen: MHC I (HLA I) und MHC II (HLA II). Auf allen kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten befinden sich MHC- Moleküle der Klasse I. Diese bestehen aus einer α -Polypeptidkette, die aufgrund einer Polygenie von 3 Genen, HLA-A, -B und -C auf dem Chromosom 6 kodiert wird, und einer leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin, lokalisiert auf Chromosom 15. MHC-Moleküle der Klasse II existieren auf der Oberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen sowie auf aktivierten T-Zellen, Endothel- und Epithelzellen. HLA II-Moleküle bestehen aus je einer α - und β -Polypeptidkette, die jeweils polygen durch die HLA DR-, DQ- und DP-Regionen auf Chromosom 6 codiert sind (Rink et al. 2012). MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren kontinuierlich Bruchstücke von intrazellulären Proteinen. Wenn der

Peptid-HLA-Molekül-Komplex an den CD-8-Corezeptor der T-Zelle bindet, wird die zytotoxische T-Zell-Reaktion ausgelöst und die Zelle vernichtet. Dies geschieht bei atypischen oder infizierten Peptiden oder fremden HLA-Molekülen. Der auf den antigenpräsentierenden Zellen befindliche MHC-II-Rezeptor präsentiert durch Phagozytose aufgenommenes Material, z.B. extrazelluläre Erreger. An diesen MHC-II-Peptid-Komplex bindet eine CD4+-Zelle und aktiviert so die antigenpräsentierende Zelle. Auf dieser Grundlage erklärt sich die Reaktion des Immunsystems auf fremde HLA-Moleküle und die Wichtigkeit, eine hohe Übereinstimmung für eine Transplantation zu finden (Rink et al. 2012).

Neben der Polygenie ist die Existenz von Polymorphismen für die Transplantationsmedizin so entscheidend, da eine außerordentlich große Anzahl verschiedener Allelvarianten der HLA-Gene vorkommen. Diese werden in der IMGT/HLA Datenbank gesammelt, so dass man eine theoretische Gesamtzahl aller möglichen HLA-Proteinkombinationen der Klassen I und II von 5×10^{37} berechnen konnte (Robinson 2003, Rink et al. 2012). Eine komplette Übereinstimmung, sog. *full house match* ist so gut wie ausgeschlossen und gelingt in extrem seltenen Fällen durch das Kopplungsungleichgewicht und regionale Häufungen von HLA-Typen (Rink et al. 2012).

Auch wenn ein HLA-identischer Spender gefunden werden konnte, besteht trotzdem das Risiko einer GVHD oder einer Transplantatabstoßung. Verantwortlich dafür sind Minor-Histokompatibilitätsantigene, Peptide, die unabhängig vom MHC von autosomalen oder Y-Chromosomen codiert und von HLA-Molekülen präsentiert werden (Goulmy et al. 1996). Allerdings wirken sie sich auch positiv auf den Graft-versus-Leukemia-Effekt (GVL) aus (s. Kapitel 2.2.3. Transplantationsarten). So sind die Rückfallraten bei HLA-identischen allogenen Transplantationen geringer als bei autologen HSZT (Zittoun et al. 1995). In mehreren Studien konnte erforscht werden, dass nach einer Entfernung der T-Zellen im Transplantat, der sog. T-Zell-Depletion, das Risiko einer GVHD sinkt, jedoch die Rückfallraten der Leukämien steigen (Hale et al. 1988, Apperley et al. 1986). Man vermutet, dass sich alloreaktive T-Zellen im Transplantat gegen verbleibende Variationen in der Aminosäuresequenz, der von den HLA-Molekülen präsentierten Peptide des Empfängers richten und so zu Transplantatabstoßung, GVHD und GVL führen können (Dickinson et al. 2004).

2.2.3 Transplantationsarten

Man unterscheidet hinsichtlich des Spenders die allogene, die autologe und die syngene Transplantation. Heutzutage werden jährlich mehr als 50.000 Patienten mit steigender Tendenz transplantiert, wobei es sich bei 57% um autologe Transplantationen und bei 43% um allogene

Transplantationen handelt. In Europa finden mit 50% die meisten HSZT statt (Gratwohl et al. 2010).

Bei der allogenen Transplantation wird ein defektes oder maligne transformiertes lymphohämatopoetisches System durch ein gesundes Spendersystem ersetzt. Voraussetzung dafür ist die vorherige Konditionierung, d.h. eine myeloablative Behandlung zur Beseitigung des pathologischen Systems und die effektive Immunsuppression zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion. Ein passender Spender kann ein HLA-genotypisch oder phänotypisch identisches Geschwister (*matched sibling donor*), ein HLA-differenter Familienspender (*mismatched related donor*) oder ein weitestgehend HLA-identischer Fremdspender (*matched unrelated donor*) sein. Das beste Outcome wird beim HLA-identischen Geschwisterspender beobachtet. Da die Wahrscheinlichkeit pro Geschwister HLA-identisch zu sein, jedoch nur 25% beträgt, sollte bei fehlender Übereinstimmung die Suche nach einem HLA-identischen Fremdspender eingeleitet werden. Das Einsetzen von HLA-differenten Geschwistern sollte Extremsituationen vorbehalten bleiben, bei denen die Zeit für die Suche eines Fremdspenders fehlt. Die Wahrscheinlichkeit ein HLA-identisches Familienmitglied zu finden, welches kein Geschwisterkind ist, beträgt unter 10 % und ist aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwands nur in Ausnahmefällen sinnvoll (Ottinger et al. 1994). Faktoren einen passenden Fremdspender zu finden sind europäische Herkunft und ein möglichst kurzer Zeitraum zwischen Diagnose und Spendersuche. Die Chancen einer erfolgreichen Spendersuche und der tatsächlichen Durchführung der Transplantation steigen stetig von Jahr zu Jahr. In einer österreichischen Studie im Zeitraum 2004-2007 konnte für 76,6% der west- und mitteleuropäischen Patienten ein passender Spender gefunden werden (Rosenmayr et al. 2011).

Bei der allogenen HSZT können sich abhängig von der Stärke der Konditionierung fremde Spenderlymphozyten gegen die Zellen des Empfängers richten und eine GVHD auslösen. Da diese Reaktion jede Zelle des Empfängers betrifft, auch Tumorzellen, wird sie gezielt zur Bekämpfung der Grunderkrankung ausgenutzt und als GVL bezeichnet. Patienten mit Leukämien profitieren von diesem antileukämischen Effekt, bei welchem fremde Stammzellen verbliebene Tumorzellen töten (Ebell 2006). Der GVL wird durch die GVHD limitiert und muss in für den Patienten optimaler Balance gehalten werden (Kolb 2008). Untersuchungen zur Verstärkung des GVL durch einen haploidentischen Spender, erbrachten keine signifikanten Ergebnisse. Das Risiko für einen Rückfall einer akuten Leukämie war für haploidentische und identische Familienspender jeweils gleich hoch, weswegen man von gleich großen GVL in beiden Gruppen ausgehen kann (Ringdén et al. 2015).

Bei der autologen Transplantation werden dem Patienten eigene kryokonservierte Stammzellen verabreicht, welche funktionsfähig und tumorfrei sein sollten. Dadurch kann, in Erwartung einer zügigen hämatologischen Rekonstitution, eine intensiviertere Behandlung von Tumoren mit höheren Dosen an Radio- und oder Chemotherapie durchgeführt werden (Ebell 2006). Auch an nicht malignen Erkrankungen als Indikation der autologen HSZT wird geforscht; so konnten 2007 in einer kleinen Studie vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Diabetes Typ 1, durch autologe HSZT ohne vorherige Myeloablation, erzielt werden (Couri et al. 2009). Bei der syngenesischen Transplantation stammen die Stammzellen von einem eineiigen Zwilling. Das Material ist wie auch bei der autologen Transplantation mit dem Empfänger genetisch identisch, wodurch eine Abstoßungsreaktion und GVHD verhindert wird, andererseits aber der GVL wegfällt (Ebell 2006).

2.2.4 Die Konditionierung

Zur Vorbereitung auf die HSZT muss eine Konditionierung erfolgen. Diese der Transplantation vorgeschaltete Behandlung erfolgt entweder als Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie oder als alleinige Chemokonditionierung. Die Konditionierung soll drei Funktionen erfüllen. Primäres Ziel ist die Induktion einer Immunsuppression beim Empfänger, um das Engraftment zu sichern und eine primäre Abstoßung zu verhindern. Eine zweite Funktion ist die anti-leukämische Wirksamkeit der Behandlung, welche möglichst viele maligne Zellen eliminieren soll. Außerdem bewirkt die Konditionierung eine Myeloablation, um den transplantierten Stammzellen einen Raum zu schaffen, sich in den neu geöffneten Knochenmarksnischen anzusiedeln. Bei Tumorerkrankungen kann durch die Myeloablation eine maximale zytostatische Therapie verabreicht werden, die auf Hämatotoxizität keine Rücksicht nehmen muss und das maligne Gewebe eliminiert. Bei autologen Transplantationen ist der immunsuppressive Effekt irrelevant, dennoch wird eine Konditionierung aufgrund der Myeloablation und des Antitumoreffekts durchgeführt. Bei Kindern mit schweren kombinierten Immundefekten entfällt die Konditionierung vor der Transplantation, da durch die Grunderkrankung nicht mit einer Abstoßung zu rechnen ist (Ebell 2006). Ein einheitliches Konditionierungsregime für alle Patienten vor HSZT kann nicht gegeben werden, da die Auswahl der Therapeutika sowie die Intensität der Konditionierung auf die individuelle Situation des Patienten angepasst werden muss. Entscheidende Faktoren in Bezug auf die gewählte Intensität sind Komorbidität, Alter, Remissionsstatus vor der HSZT, Rezidivrisiko und der je nach Erkrankung unterschiedlich ausgeprägte GVL. Aus der immunsuppressiven Wirkung der Konditionierung und der Toxizität der verwendeten Zytostatika- und oder

Strahlentherapie ergeben sich zahlreiche Nebenwirkungen. Die Immunsuppression bedingt ein extrem hohes Infektionsrisiko. Die Radiotherapie kann als Frühreaktion Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Hautirritationen, Parotitis, Mukositis, Xerostomie und Alopezie verursachen. Spätreaktionen sind u.a. interstitielle Pneumonitis, Katarakte, Störungen der Hypophyse und Gonaden oder auch Sekundärtumoren. Chemotherapeutika können u.a. mit Leberschädigung, Lungenfibrose und Neurotoxizität einhergehen (Ebell 2006). Um die Toxizität der Konditionierung zu senken und Nebenwirkungen zu vermindern, wird in manchen Fällen z.B. bei Komorbiditäten eine intensitätsreduzierte Konditionierung durchgeführt. Die Dosis des Zytostatikums wird in dem Maße reduziert, dass das *Engraftment*, das Anwachsen der gespendeten Stammzellen, nicht gefährdet wird. Dadurch kommt es zu einer niedrigeren, nicht-Rezidiv-bezogenen Mortalität, aber einer höheren Progressrate der Grunderkrankung (Gahrton et al. 2007, Bornhauser et al. 2001).

2.2.5 Die hämatologische und immunologische Rekonstitution

Nach erfolgter Konditionierung und Transplantation folgt die besonders kritische neutropene Phase, da durch die Vorbehandlung das lymphohämatopoetische System des Patienten nicht mehr existent ist und das Spendersystem noch nicht angewachsen ist. Das Engraftment macht sich durch einen Anstieg der Granulozyten und Thrombozyten und das Vorhandensein von Retikulozyten bemerkbar. Wenn an drei aufeinander folgenden Tagen die Zahl der neutrophilen Granulozyten $> 0,5 \times 10^9 / l$ beträgt, ist das Transplantat in den Knochenmarksnischen angekommen und die immunologische Rekonstitution beginnt (Diaz et al. 2000). Wie schnell dieser Prozess vonstattengeht, ist von Patient zu Patient individuell und von mehreren Faktoren abhängig. Dazu zählen das Alter von Spender und Patient, die Transplantationsindikation, das Konditionierungsregime, der Spendertyp, die Stammzellquelle, die Modifikation des Transplantats, das Auftreten von Infektionen, die GVHD-Prophylaxe und das Auftreten einer GVHD und deren Behandlung. Eine verzögerte Immunrekonstitution erhöht das Risiko von schwerwiegenden Infektionen und Rückfällen und geht daher mit einer niedrigeren Überlebensrate einher (Einsele und Hebart 2001, Oshrine et al. 2013, Mitra et al. 2002). In einem Zeitraum von zwei bis vier Wochen erholt sich das hämatopoetische System nach der Transplantation. Vorläuferzellen binden über Selektine an die Endothelzellen im Knochenmark, verlangsamen ihre Geschwindigkeit, sog. *Rolling*, und lösen eine Kaskade aus Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus, die letztendlich zur Ansiedlung der transplantierten Zellen in den Knochenmarksnischen führt, sog. *Homing* (Ebell 2006, Haas und Kronenwett 2005). So gewährleisten die Vorläuferzellen eine schnelle, aber nur kurz andauernde Erholung, währenddessen die im Transplantat enthaltenen pluripotenten

Stammzellen eine langfristige und vollständige Neubildung aller Blutzellreihen bewirken (Bender et al. 1992). Während sich das hämatopoetische System und die unspezifische zelluläre Immunität (Granulozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen) schnell erholen, braucht die Rekonstitution der T- und B- Zellen nach HSZT mehr Zeit, nach autologer HSZT ca. drei Monate und nach allogener HSZT bis zu zwei Jahren. Bei der allogenen HSZT erfolgt zunächst ein passiver Transfer der spezifischen Immunität, welcher bei T-Zell-Depletion im Transplantat entfällt (Ebell 2006). Die aktive T-Zell-Rekonstitution beginnt drei Monate nach Transplantation und erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen. Auf dem zentralen Weg werden de novo naive T-Zellen im Thymus aus den transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen generiert. Nachweisbar sind diese frischen T-Zellen durch Bestimmung des T-Zell-Rezeptor-Exzisions-Zyklus sowie durch das Oberflächenantigen CD45RA, welches sich auf unreifen T-Zellen befindet (Al-Harthi et al. 2000). Auf dem peripheren Weg expandieren antigen-getriggert reife T-Zellen aus dem Transplantat, unabhängig von der Thymusfunktion. Diese gewährleisten hauptsächlich die Immunrekonstitution, da es durch die Konditionierung in vielen Fällen zu einer Schädigung des Thymus kommt und so der zentrale Weg verlangsamt ist. Werden diese reifen T-Zellen durch eine CD34+-Selektion aus dem Transplantat entfernt, setzt die Immunrekonstitution verspätet ein (Sutherland et al. 2008).

2.3 Komplikationen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Eine Indikation zur HSZT wird niemals leichtfertig gestellt, sondern ist für viele Patienten die letztmögliche kurative Therapiemöglichkeit, auch wenn mit lebensbedrohlichen Komplikationen nach Durchführung der HSZT gerechnet werden muss. Diese treffen den, durch die Grunderkrankung und die Toxizität der Konditionierung, geschwächten Organismus beinahe schutzlos und müssen durch Prophylaxe und frühzeitige Therapie abgemildert werden, um ein Überleben des Patienten sicherzustellen. Allgemeine Nebenwirkungen der Chemotherapie und Bestrahlung im Rahmen der Konditionierung wurden bei den Grundlagen der HSZT bereits erörtert, währenddessen sich dieses Kapitel selteneren Komplikationen und Komplikationen durch Infektionen, insbesondere AdV-Infektionen widmet.

2.3.1 Transplantatabstoßung

Überleben trotz vorheriger Konditionierung ausreichend T-Lymphozyten im Körper des Patienten, kommt es entweder zum Nicht-Anwachsen des Transplantats, sog. *Non-Engraftment*, zur primären Transplantatabstoßung oder nach einer Regenerationsphase zur T-Zell-vermittelten sekundären Transplantatabstoßung, welche sich durch plötzliche Neutropenie nach erfolgreichem Anwachsen des Transplantats bemerkbar macht. Das Abstoßungsrisiko ist bei

Stammzelltransplantaten aus Nabelschnurblut, haploidentischen und T-Zell-depletierten Transplantaten erhöht (Ebell 2006, Bornhauser et al. 2002, Moscardo et al. 2014).

2.3.2 Graft-Versus-Host Krankheit

Da bei einer HSZT immunkompetente Zellen transplantiert werden, besteht nicht nur die Gefahr einer Abstoßung, also einer Host-Versus-Graft-Reaktion, sondern auch der entgegengesetzte Mechanismus kann zu Komplikationen führen. Dabei handelt es sich um die GVHD, bei der sich die transplantierten Zellen gegen Gewebe im Wirt richten und damit schwere Schäden verursachen. Die GVHD ist eine der kritischsten Komplikationen nach HSZT. Sie wird unterschieden in eine akute Form, welche in den ersten 100 Tagen nach Transplantation auftritt und in eine chronische Form, welche entweder aus der akuten Form entsteht oder de novo jenseits der ersten 100 Tage nach Transplantation auftritt (Deeg 1994). Trotz einer immunsuppressiven Prophylaxe erleiden 20-50 % aller transplantierten Patienten eine akute GVHD II. Grades oder höher. Gründe für deren Auftreten sind Teil komplexer Prozesse und liegen in Disparitäten der HLA- und minor-HLA-Antigene sowie in einem durch Polymorphismen entstandenen Ungleichgewicht bestimmter Zytokine. So gehen beispielsweise hohe Level des Tumornekrose-Faktor- α und geringe Level von Interleukin 10 vor der Transplantation mit einem höheren Auftreten akuter GVHD nach HSZT einher. Im Zuge der Transplantation wird durch die Konditionierung und eventuelle Infektionen Gewebe des Spenders verletzt. So translozieren u.a. bakterielle Endotoxine vom Darm in den Blutkreislauf und lösen eine Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen aus. Dieser Prozess führt zur Hochregulation der MHC-Antigene auf den Antigen-präsentierenden-Zellen und schließlich zu einer Immunantwort alloreaktiver reifer T-Zellen aus dem Transplantat. Die Intensität des ausgelösten Zytokinsturms bestimmt dabei die Schwere der akuten GVHD in besonderem Maß mit (Ball und Egeler 2008). Zielorgane der akuten GVHD sind v.a. Haut, Leber und Darm. Sie äußert sich häufig zuerst durch einen juckenden, makulopapulösen Hautausschlag an Handflächen, Fußsohlen und Ohren, welcher sich am ganzen Körper ausbreiten kann und in seiner heftigsten Ausführung mit Blasenbildung und völliger Hautablösung einhergeht. Oft kommen danach gastrointestinale Symptome wie Erbrechen, Übelkeit, Diarrhöe mit Blutbeimengungen und Bauchschmerzen hinzu, in der schwersten Ausprägung ein paralytischer Ileus. Seltener treten hepatische Symptome auf, zum Beispiel Hyperbilirubinämie, Aszites, verlängerte Blutungszeit und hepatische Enzephalopathie (Ferrara und Deeg 1991). Die akute GVHD wird nach dem Seattle-Schema nach den am häufigsten betroffenen Organen - Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt - in Schweregrade eingeteilt (s. Tab. 1). Aus dem Zusammenwirken der Schweregrade an den einzelnen Organen ergibt sich

der Gesamtgrad der GVHD. Je nachdem ob ein oder mehrere Organe betroffen sind und in welchem Umfang, teilt man die GVHD in Grad 0, I, II, III und IV ein, siehe Tab. 1 und 2, modifiziert nach Glucksberg (Glucksberg et al. 1974).

Tab. 1: Schweregradeinteilung der akuten GVHD nach Organen

Schweregrad	Klinisches Bild	Bilirubin mg/dl	Diarrhoe ml/Tag
	Haut	Leber	Darm
1	Exanthem < 25 % KO	2 - 3	500 - 1000
2	25-50% KO	3 - 6	1000 - 1500
3	50% KO	6 - 15	1500 - 2000
4	Generalisiert, Erythrodermie, oft Desquamation und Bullae	> 15	> 2000 oder schwere abdominelle Schmerzen und / oder Ileus

Tab. 2: Gesamtschweregrad der akuten GVHD

Grad	Haut	Leber	Darm
0	0	0	0
I (leicht)	1-2 0	0 0-1	0 0-1
II (moderat)	0 1-3 3	0-1 1 0	1 0-1 0
III (schwer)	2-3	2-3	2-3
IV (lebensbedrohlich)	2-4	2-4	2-4

Prophylaxemaßnahmen beinhalten die Gabe von Methotrexat, Ciclosporin A, Kortikosteroide und anderen Immunsuppressiva wie Tacrolimus in verschiedenen Dosen und Kombinationen, je nach individueller Gefährdung des Patienten (Chao et al. 2000, Nash et al. 2000). Bei besonders hohem GVHD-Risiko z.B. bei HLA-differenten Transplantaten kann zusätzlich eine Ex-vivo-T-Zell-Depletion oder eine In-vivo-Antikörper-Therapie zur Reduktion des Risikos eingesetzt werden. Für letztere steht polyklonales Tierserum vom Pferd oder Kaninchen, sog. Antithymozytenglobulin (ATG) zur Verfügung (Bacigalupo et al. 2002). Therapeutisch kommen zunächst Kortikosteroide zum Einsatz, während bei Nicht-Ansprechen auf monoklonale, humanisierte Antikörper oder ultraviolette Bestrahlung in Kombination mit Psoralen (PUVA) zurückgegriffen wird. Eine Besserung der GVHD wird hierbei jedoch mit einem signifikanten Anstieg des Infektionsrisikos bezahlt (Furlong et al. 2002).

Eine chronische GVHD entwickeln ca. 10-15% der Patienten im Kindesalter. Sie unterscheidet sich pathophysiologisch durch eine Autoimmunkomponente und kann praktisch jede Autoimmunerkrankung imitieren. Sie manifestiert sich beispielsweise als Lichen planus, Poikilodermie, Leukodermie, Pemphigoid, Lupus-ähnlichem Krankheitsbild, Polymyositis oder Sklerodermie. Außerdem können dauerhafte Alopezien, Nagelveränderungen, Dysphagien oder neuromuskuläre Veränderungen auftreten. Therapeutisch werden Kortikosteroide, Azathioprin, Immunsuppressiva bis hin zu Cyclophosphamid eingesetzt, wobei nicht alle schweren Formen der chronischen GVHD behandelbar sind (Ebell 2006, Grauer et al. 2010).

2.3.3 Infektionen

Infektionen sind eine gefürchtete Komplikation nach HSZT, die die Mortalität und Morbidität erheblich steigern. In den letzten Jahren konnte unter anderem durch verbesserte Maßnahmen in der Supportivtherapie, neue anti-infektiöse Medikamente, besseres Verstehen der Vorgänge von Immunsuppression und Konditionierung und daraus folgend angepasster Therapiestrategien, die durch Infektionen verursachte Letalität gesenkt werden, aber es sind weitere Verbesserungsstrategien von Nöten (Gratwohl et al. 2005). Risikofaktoren für eine Infektion nach Transplantation sind der Status der Grunderkrankung, Komorbiditäten, Grad der Neutropenie, die Beschädigung der Schleimhautbarrieren z.B. durch Mukositis oder Verweilkatheter, verzögerte Immunrekonstitution und immunsuppressive Therapie. Die Zeit nach der HSZT kann in 3 Phasen eingeteilt werden: die Pre-Engraftment-Phase (Tag 0-30 nach HSZT), die Post-Engraftment-Phase (Tag 30-100 nach HSZT) und die späte Phase (Tag 100-

>365 nach HSZT). In jeder Phase dominieren unterschiedliche Risikofaktoren und Pathogene das klinische Bild (Tomblyn et al. 2009).

In der Pre-Engraftment-Phase steigern eine verlängerte Neutropenie und Verletzungen der Schleimhaut, im Rahmen einer schweren Mukositis, das Infektionsrisiko bezüglich Bakterien, Pilzen und Viren (Gudiol et al. 2014). Die ersten 2-4 Wochen nach Transplantation sind am kritischsten. In dieser Phase sind alle Fieberphasen primär als potentielle Sepsis zu betrachten. Bakteriämien werden häufig durch grampositive Erreger wie Koagulase-negative Staphylokokken, *Streptococcus viridans* und *Enterococcus faecalis*, aber auch gramnegative Erreger wie z.B. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst. Die antibiotische Behandlung sollte zügig beginnen und das gesamte Spektrum der gramnegativen und grampositiven Keime erfassen, sofern der Keimnachweis noch nicht vorhanden ist. Auch eine Prophylaxe im Anschluss an die Konditionierung vermindert das Auftreten schwerer Infektionen (Ebell 2006, Lark et al. 2001, Tomblyn et al. 2009). Mit ähnlichen Risikofaktoren behaftet spielen Pilzinfektionen in der Pre-Engraftment-Phase eine wichtige Rolle, wobei invasive Mykosen mit einer erheblich höheren Letalität einhergehen als durch Bakterien verursachte Sepsen. Besonders problematisch sind hierbei aerogen erworbene Aspergillosen, während Hefepilze der *Candida*-Spezies häufig non-invasiv die Schleimhäute besiedeln (Ascioglu et al. 2002). Da Pilze trotz zahlreicher Nachweisverfahren oft schwer zu diagnostizieren sind, muss bei jedem Fieber unklarer Genese in dieser Phase auch an eine antimykotische Therapie gedacht werden. Außerdem ist der Einsatz von Hochleistungsluftfiltern in Transplantationszimmern zur Vermeidung von Aspergillosen sinnvoll (Ebell 2006). Die Patienten sind außerdem von Neuinfektionen oder endogenen Reaktivierungen vieler Viren betroffen, welche in kurzer Zeit schwerwiegende, auch oft tödliche Verläufe annehmen, zum einen durch den zytopathischen Effekt, als auch durch die Induktion eines inflammatorischen Prozesses, der zu genereller T-Zell-Aktivierung mit GVHD und Multiorganversagen führt. Da diese Komplikationen in voller Ausprägung kaum noch behandelbar sind, müssen, ein falls möglich, quantitatives Screening mittels Virusdirektnachweisen und präemptive Behandlungsstrategien, mit Beginn der antiviralen Therapie ab Virusnachweis zur notwendigen Routine gehören, um einem Ausbruch der Viruserkrankung zuvorzukommen (Ebell 2006). In der Pre-Engraftmentphase kommt es zu verstärkten Reaktivierungen des Herpes-Simplex-Virus, enterischer Viren wie Adeno-, Noro- und Rotaviren und respiratorischer Viren wie dem Respiratory-Syncytial-Virus (Tomblyn et al. 2009).

Die Post-Engraftment-Phase beginnt mit dem Anwachsen des Spendermarks. Zwar verschwinden Neutropenie und Mukositis, aber Probleme durch Verweilkatheter, verzögerter Immunrekonstitution und funktioneller Asplenie bleiben bestehen und werden ggf. durch das Auftreten einer GVHD und deren Behandlung verschlimmert. Bakteriämien werden in der Post-Engraftment-Phase seltener beobachtet. Zu Herpes-Simplex-Viren, enterischen Viren und Respiratory-Syncytial-Viren gesellen sich nun vor allem Zytomegalie-, Epstein-Barr-, und BK-Viren. Außerdem treten verstärkt Infektionen mit dem opportunistischen Erreger *Pneumocystis jirovecii* auf.

Infektionen in der späten Phase, welche 100 Tage nach HSZT beginnt, gehen meistens mit chronischer GVHD einher, da diese die normale Immunrekonstitution verzögert. Erreger dieser Phase sind bekapselte Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, Zytomegalievirus, Varizella-Zoster-Virus, Schimmelpilze sowie *Pneumocystis jirovecii* (Tomblyn et al. 2009).

2.4 Adenoviren

2.4.1 Charakterisierung

AdV sind eine der am weitest verbreiteten Virusarten und können Säugetiere, Vögel, Fische und Reptilien gleichermaßen infizieren (Davison et al. 2003). 1954 wurde zum ersten Mal HAdV aus Rachenmandeln isoliert und nach ihrem Erstbestimmungsort benannt. AdV sind ubiquitäre, unverpackte, doppelsträngige DNA-Viren, welche eine Größe von 65 – 80 Nanometer im Durchmesser aufweisen. Ihr 36 Kilobasen großes, lineares Genom ist in einem ikosaedrischen Kapsid kondensiert, aus dessen 12 Ecken jeweils ein Spike zur Anheftung an die Wirtszelle ragt (Walls et al. 2003, Fuchs et al. 2007). Per Endozytose gelangen sie in die Zelle und werden zum Zellkern transportiert, um dort die Transkription und Replikation einzuleiten. Dadurch sind sie auch geeignete Kandidaten für die Übertragung und Expression therapeutischer Gene (Russell 2000). Bisher konnten 56 Serotypen gefunden werden, deren Zahl weiter ansteigt und welche nach den Subgruppen A-G klassifiziert werden (Heim 2011). Am häufigsten werden Erkrankungen durch die Serotypen 1,2,5,7 und 35 verursacht. AdV vermehren sich langsam, sind extrem widerstandsfähig und können sogar in einer trockenen Umgebung bei Raumtemperatur 3 Wochen infektiös bleiben (Hara et al. 1990). Weder der niedrige pH-Wert in der Magensäure noch die Beschaffenheit der Gallenflüssigkeit verhindert ein Eindringen in die Epithelzellen, sodass AdV in der Lage sind, alle Schleimhäute zu infizieren (Echavarria 2008).

2.4.2 Krankheitsverlauf

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Terminus AdV-Infektion, schließt die Pathomechanismen der AdV-Reaktivierung und der AdV-Neuinfektion ein. Verläuft die AdV-Infektion symptomatisch, spricht man von einer AdVE. AdV sind im Kindesalter endemisch und verantwortlich für 5-10 % der oberen Atemwegsinfektionen bei immunkompetenten Kindern. Der Altersgipfel für die AdV-Infektion liegt zwischen 6 Monaten und 5 Jahren. Krankheitsbilder sind die Konjunktivitis, die Gastroenteritis, Atemwegserkrankungen, Harnwegsinfekte und selten Hepatitis. Die Erkrankung ist bei immunkompetenten Kindern selbstlimitierend (George et al. 2012). AdV können in den menschlichen Tonsillen persistieren, ohne erkennbare Schäden anzurichten. Unter Immunsuppression kann das HAdV reaktivieren und plötzlich schwerwiegende Symptome auslösen. Da die AdV-Infektion bei Immunsupprimierten keine saisonalen Häufigkeiten aufweist, kann man davon ausgehen, dass die Patienten eher durch eine endogene Reaktivierung erkranken als durch Neuinfektion. Dabei persistieren AdV in Adenoiden und Tonsillen, insbesondere in CD3+ T-Lymphozyten, aber auch im Darmtrakt (Garnett et al. 2009). Es wurde auch diskutiert, ob eine Übertragung über das Transplantat, ähnlich dem Übertragungsweg des Zytomegalievirus, stattfindet. Diese These konnte jedoch nach aktuellen Erkenntnissen nicht bestätigt werden (Patel et al. 2015). Durch eine Ausbreitung in den regionalen Lymphknoten, kommt es unter Immunsuppression häufig zu generalisierten Verläufen. Die Inzidenz nach HSZT bei Kindern liegt bei etwa 30%, wobei die Inzidenz der schweren disseminierten AdV-Infektion ca. 10 % beträgt (Heim 2011). Die Initialphase verläuft hierbei entweder asymptomatisch oder ist durch eine obere Atemwegserkrankung oder Blasenentzündung gekennzeichnet. Kann sich das HAdV ungestört ausbreiten, kommt es zu schweren Organmanifestationen in Form einer Pneumonie, Gastroenteritis, Hepatitis oder hämorrhagische Zystitis; oder auch zu einer disseminierten, generalisierten Erkrankung mit septischem Verlauf bis hin zum Multiorganversagen mit hoher Morbidität und Mortalität. Laut Studienlage liegt die Mortalität der disseminierten AdV-Infektion bei Kindern nach allogener HSZT bei bis zu 82 % (Lion et al. 2003, Fuchs et al. 2007, George et al. 2012, Heim 2011). Bisher erforschte Risikofaktoren für das Auftreten der AdV-Infektion nach HSZT sind haploidentische Stammzellspenden, akute GVHD, T-Zell-Depletion im Transplantat, Lymphozytenwerte unter 300/ μ l, Bestrahlung und ein jüngerer Alter zum Transplantationszeitpunkt (Heim 2011, Yaghobi et al. 2011). Verzögerte Immunrekonstitution begünstigt das Auftreten einer AdV-Infektion und gleichzeitig führt die AdV-Infektion zu einer weiteren Verlängerung des Immunaufbaus (Taniguchi et al. 2012).

2.4.3 Diagnostik und Therapie

Schnelles Handeln im Falle einer Reaktivierung oder Neuinfektion mit AdV ist dringend erforderlich, um dies mit Hilfe eines schnellen und präzisen Nachweises der Viren gelingen. Die üblichen serologischen Untersuchungen sind bei immunsupprimierten Patienten aufgrund der geringen Antikörperbildung wenig zielführend und zudem ungenau, da es sich bei AdV-Infektionen in vielen Fällen um Reaktivierungen handelt (Voshaar et al. 2009). Heutzutage spielen die qualitative und quantitative PCR in diversen Körperflüssigkeiten die entscheidende Rolle zum Nachweis von AdV, welche auch die Antigenbestimmungen wie den Komplementbindungstest und den ELISA aufgrund geringer Sensitivität und die Zellkulturverfahren als „Goldstandard“ wegen ihrer langen Nachweisdauer und dem hohem technischen Aufwand mehr und mehr ablösen (Ganzenmueller et al. 2011, Jeulin et al. 2011, Bil-Lula et al. 2010, Ebner et al. 2006). Das molekulare Monitoring von AdV im peripheren Blut ist dabei ein zuverlässiger Marker für die disseminierte AdV-Infektion (Lion et al. 2003). Die Möglichkeit einer quantitativen PCR zur Bestimmung der Viruslast ist noch nicht an allen Transplantationszentren gegeben, aber dennoch unbedingt empfehlenswert, da die Anzahl der quantifizierten Kopien im direktem Verhältnis zur Schwere der Organpathologie steht. Dies ist sowohl durch den zytopathischen Effekt als auch durch hohe Viruslasten entstehende zirkulierende Immunkomplexe und darauf folgend eine Komplementaktivierung mit Zytokinsturm und Interaktion von AdV und Thrombozyten zu erklären (Heim 2011).

Für die AdV-Infektion im Vollbild nach HSZT ist derzeit keine ausreichend wirksame Therapie verfügbar. Idealerweise müsste die immunsuppressive Behandlung unterbrochen werden, welches in den meisten Fällen durch gleichzeitige GVHD oder das Risiko einer Transplantatabstoßung nicht gewährleistet werden kann. Deswegen sind antivirale Medikamente dringend von Nöten. Aktuell werden im Wesentlichen die Pyrimidin- bzw. Purinanaloga Cidofovir und Ribavirin verwendet. Beide sind in vitro gegen AdV wirksam, in vivo hat jedoch bisher Cidofovir besserer Ergebnisse und mehr klinische Erfahrungen zu verzeichnen, welche jedoch von dessen Nephro- und Myelotoxizität limitiert werden (Legrand et al. 2001, Ljungman et al. 2003).

Eine Vorstufe des Cidofovir - das CMX001 - wird derzeit in einer Phase III-Studie ausgiebig getestet und weist neben einer guten Wirksamkeit keine nephrotoxischen Nebenwirkungen auf (Lanier et al. 2010). Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist die sog. adoptive Therapie, bei der prophylaktisch oder interventionell virusspezifische Spenderlymphozyten transfundiert werden (Heim 2011, Chatziandreou et al. 2007).

3 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von AdV-Infektionen nach HSZT, speziell ihrer Risikofaktoren und Therapiemöglichkeiten. Dafür wurden die Daten von 262 Kindern ausgewertet, die von 01/1999 bis 10/2011 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Jena eine HSZT erhielten. Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Bei wie vielen Kindern konnten ADV nachgewiesen werden?
- Wie viele Kinder erlitten eine schwerwiegende AdV-Infektion?
- Wie viele Kinder starben durch eine AdV-Infektion?
- Beeinflussen Alter und Geschlecht das Auftreten einer AdV-Infektion?
- Hat die Transplantationsart, der Spendertyp oder die CD-34-Selektionierung im Transplantat Einfluss auf das Auftreten einer AdV-Infektion?
- Welchen Einfluss hat die Konditionierung und gibt es einen Unterschied zwischen verschiedenen Konditionierungsregimes?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen GVHD und AdV-Infektion?
- Wo werden ADV nachgewiesen und gibt es Nachweismethoden, die mit einer größeren Letalität behaftet sind?
- Welchen Einfluss haben welche Therapiestrategien und hat ein früher Start der Therapie einen Einfluss auf das Outcome?

4 Patienten, Materialien und Methoden

4.1 Patienten

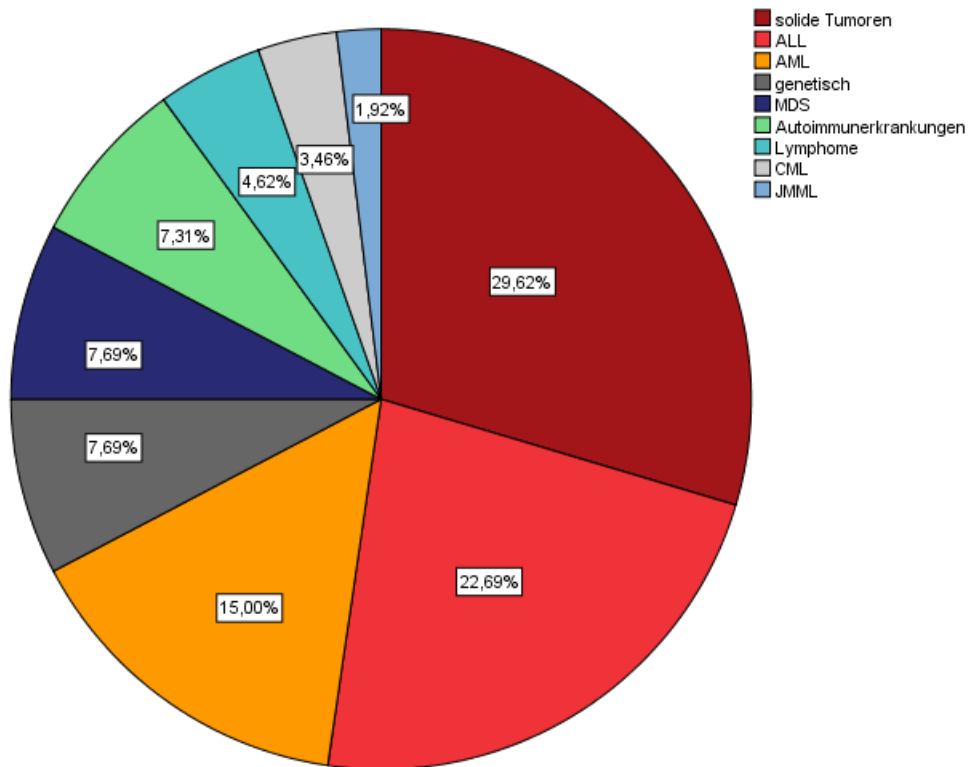
4.1.1 Patientencharakteristik

Der für die retrospektiven Analysen zugrundeliegende Patientenstamm umfasst 262 Kinder, welche von 01/1999 bis 10/2011 in der Kinderklinik der Universität Jena eine HSZT erhielten.

Die Patienten waren im Alter von 2 Monaten (Minimum) und 26 Jahren (Maximum). Das mediane Alter der Patienten betrug 10 Jahre und das mittlere Alter 9,63 Jahre. Es wurden 161 Jungen (61,5 %) und 101 Mädchen (38,5%) transplantiert, dargestellt in Tab. 3.

Der größte Anteil der Patienten litt an einer soliden Tumorerkrankung, die bei 78 Patienten (29,62%) vorlag und Diagnosen wie Hirntumor, Ewingsarkom, Keimzelltumor und Klarzellsarkom einschloss. An einer akuten lymphoblastischen Leukämie erkrankten 60 Patienten (22,4 %), gefolgt von der akuten myeloischen Leukämie, an welcher 40 Kinder erkrankten (14,8 %). Bei 20 Patienten (7,6%) wurde das Myelodysplastische Syndrom festgestellt und bei ebenfalls 20 Patienten (7,6%) stellten genetische Erkrankungen die Indikation zur Transplantation. Autoimmunerkrankungen führten bei 19 Kindern (7,2%) zur Transplantation. Des Weiteren wurden 12 Lymphomerkrankungen (4,6%) diagnostiziert. Die chronisch myeloische Leukämie führte in 9 Fällen (3,4%) und die juvenile myelomonozytäre Leukämie in 5 Fällen (1,9%) zu einer HSZT. Diese beschriebenen Erkrankungen, welche die Indikation für die Ersttransplantation darstellten, sind in Abbildung (Abb.) 1 ersichtlich.

Abb. 1: Grunderkrankung der Patienten



ALL = akute lymphoblastische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, CML = chronische myeloische Leukämie, JMML = Juvenile myelomonozytäre Leukämie

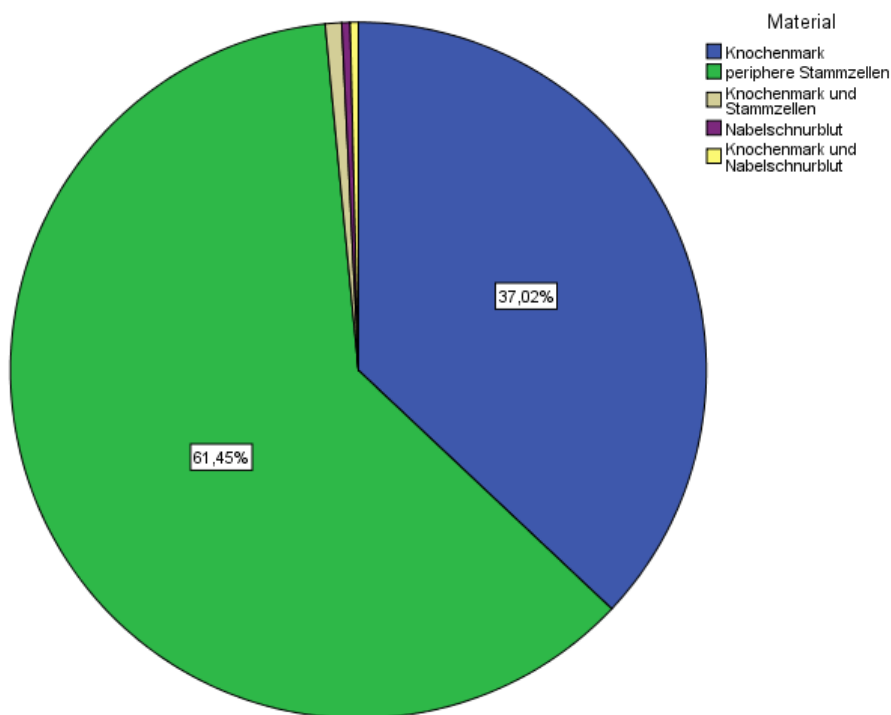
Bei den untersuchten Patienten wurden 179 (68,3%) allogene und 83 (31,7%) autologe Transplantationen durchgeführt. Für die allogenen Transplantationen konnten 43 Geschwisterspender (24,0%) und 136 Fremdspender (76,0 %) gefunden werden. 133 Patienten mit allogener HSZT wurden HLA-identisch transplantiert (74,7%) und 45 Patienten wurden haplo- oder nichtidentisch transplantiert (25,3%). Als identisch wurde ein Spender anerkannt, wenn auf folgenden Loci Übereinstimmungen zu finden waren:

- HLA-A
- HLA-B
- HLA-C

- HLA-DRB1
- HLA-DQB1

Als Stammzellquelle diente in 97 Fällen (37,0%) das Knochenmark, in 161 Fällen (61,5%) periphere Blutstammzellen und in 2 Fällen (0,8%) eine Kombination aus Knochenmark und peripheren Blutstammzellen. Bei einer Transplantation (0,4%) wurde Nabelschnurblut verwendet und bei einer weiteren eine Kombination aus Knochenmark und Nabelschnurblut (0,4%), siehe Abb. 2. Bei 83 der 161 Patienten, welche periphere Blutstammzellen erhalten haben, wurde eine Leukapharese zur CD-34+-Selektion durchgeführt (51,6 % der peripheren Blutstammzellen und 31,7% des gesamten Patientenkollektivs).

Abb. 2 : Stammzellquelle für HSZT



Tab. 3: Patientencharakteristik

Merkmal		Anzahl	Prozent
Patienten insgesamt		262	100
Patienten mit AdV		28	10,7
generalisierte AdV-Infektion	bezogen auf alle	10	3,8
	bezogen auf AdV-Infizierten	10	35,7
letale AdV-Infektion	bezogen auf alle	7	2,67
	bezogen auf AdV- Infizierten	7	25,0
Geschlecht	männlich	161	61,5
	weiblich	101	38,5
Alter bei Transplantation	median	10 Jahre	
	mittleres	9,63 Jahre	
	Bereich	2 Monate bis 26 Jahre	
Konditionierung	Chemotherapie	201	76,7
	Radiochemotherapie	61	23,3
	mit ATG	125	47,7
	ohne ATG	137	52,3
Transplantationsart	allogen	179	68,3
	autolog	83	31,7
Spendertyp	Fremdspender	136	76,0*
	Geschwisterspender	43	24,0*
HLA-Übereinstimmung	HLA-identisch	133	74,7*
	haploidentisch / nicht identisch	45	25,3*
Stammzellquelle	KM	97	36,9
	PBSZ	162	61,6
	KM+PBSZ	2	0,8
	Nabelschnurblut+KM	1	0,4
	Nabelschnurblut	1	0,4
GvHD	akut	83	46,4*
	chronisch	25	14,0*
verstorben	Ja (bezogen auf alle)	110	42,0
	Ja (bezogen auf ADV-Patienten)	18	64,3

Nein (bezogen auf alle)	152	58,0
Nein (bezogen auf ADV-Patienten)	10	35,7

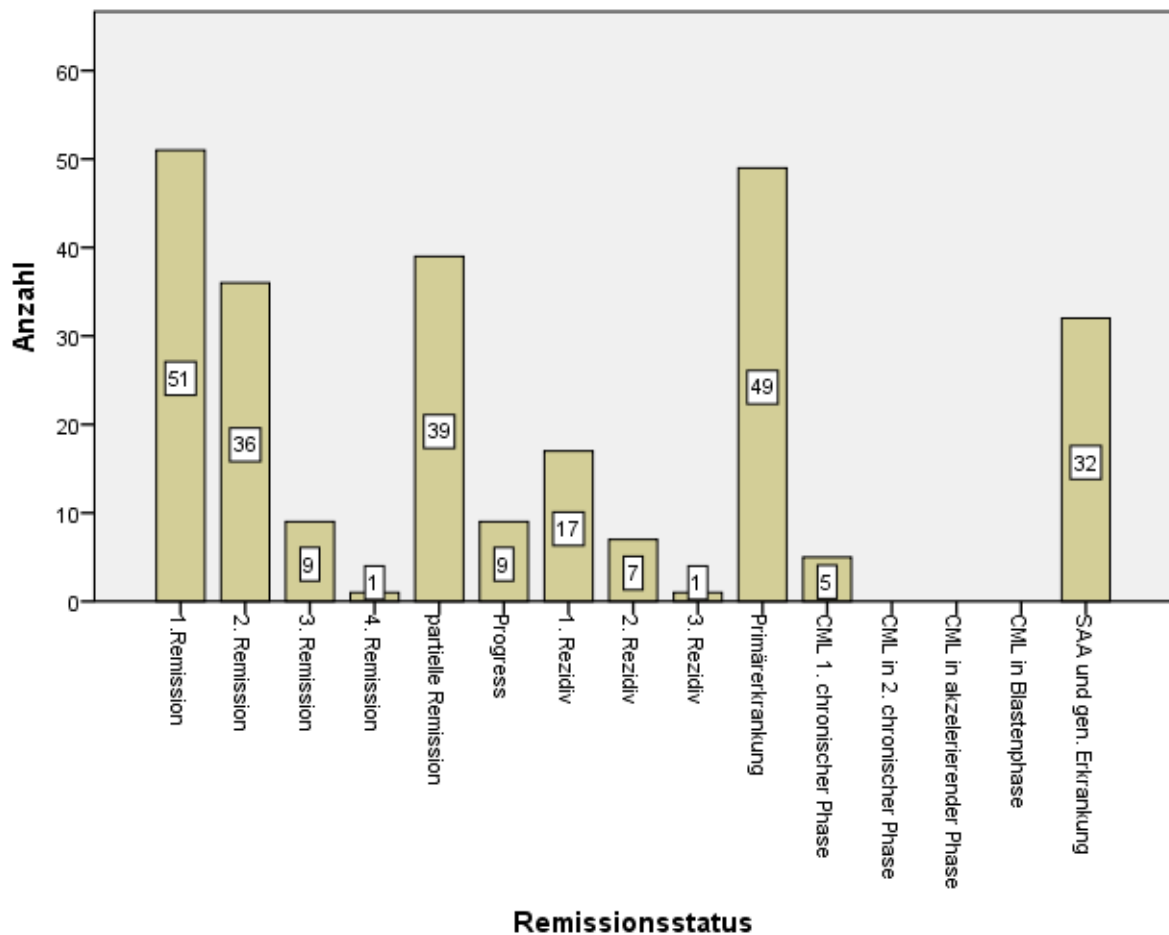
KM = Knochenmark, PBSZ = periphere Blutstammzellen * % auf autologe Transplantation bezogen

4.2 Ablauf der Stammzelltransplantation

4.2.1 Transplantationszeitpunkt

Der Transplantationszeitpunkt wird durch die Grunderkrankung und den individuellen Krankheitsverlauf des Patienten bestimmt. Wenn möglich, soll die HSZT bei malignen Erkrankungen in einer Phase der Remission durchgeführt werden. In der untersuchten Patientengruppe handelte es sich im Normalfall um die 2. Remission. Bei Therapieversagen, Zugehörigkeit zu einer Hochrisikogruppe oder genetischen Erkrankungen erfolgte die Transplantation in einer anderen Phase des Krankheitsverlaufs. 51 Patienten (19,4%) wurden in erster Remission transplantiert; 36 Patienten (13,7%) in 2. Remission, 9 Patienten (3,4%) in 3. Remission und 1 Patient in 4. Remission (0,4%). Weitere 39 Patienten (14,8%) befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation in partieller Remission. Während der Primärerkrankung wurden 49 Transplantationen durchgeführt (18,6%), im ersten Rezidiv 17 Transplantationen (6,5%), im zweiten Rezidiv 7 (2,7%), im dritten Rezidiv wurde 1 Patient transplantiert (0,4 %). Bei 9 Patienten (3,4%) war die Tumorerkrankung zum Transplantationszeitpunkt im Progress. 5 Patienten (1,9%) befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation in der 1. chronischen Phase einer chronisch myeloischen Leukämie. Die übrigen 32 Transplantationen (12,2 %) wurden bei nichtmalignen Erkrankungen durchgeführt bzw. war der Remissionstatus fehlend (s. Abb. 3).

Abb. 3: Remissionsstatus der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation



CML = chronisch myeloische Leukämie, SAA = schwere aplastische Anämie

4.2.2 Vorbereitung der Transplantation

Vorbereitend erhielten die Patienten einen zentralvenösen Verweilkatheter (Hickman-Katheter) für diagnostische Blutentnahmen, die Konditionierung, die eigentliche HSZT und weitere intravenöse Therapien. Während der Verweildauer des Katheters wurde auf einen sterilen Umgang geachtet und bei Nichtverwenden wurde der Katheter mit Heparin geblockt, um ein Zusetzen zu verhindern. Vierzehn Tage vor der HSZT startete die Dekontaminierung der Patienten. Die Kopfhaare wurden rasiert, die Patienten erhielten sterile Kost und Kleidung und wurden in eine Laminar-Airflow-Einheit verlegt. Zusätzlich erfolgte eine medikamentöse Dekontamination des Darmes mit den in Tab. 4 aufgeführten Medikamenten.

Tab. 4: Medikation zur Darmdekontamination

Medikament	Dosis
Amphotericin B	4 x 100 mg/d bei Kindern < 4 Jahre 4 x 200 mg/d bei Kindern > 4 Jahre
Colistin	150000 IE/kg/d in 4 Einzeldosen

4.2.3 Konditionierung

Je nach Grunderkrankung und Risikoprofil erfolgte die Konditionierung vor der HSZT in ganz unterschiedlichen Konditionierungsregimes entweder als Chemotherapie oder kombinierter Radiochemotherapie. Im untersuchten Zeitraum erfolgte die Konditionierung in 201 Fällen (76,7%) als Chemotherapie und in 61 Fällen als Radiochemotherapie (23,3 %). Das immunsuppressive Medikament ATG, welches gegen humane T-Zellen gerichtet ist, wurde bei 125 Patienten zur Konditionierung verabreicht (47,7%) und in 137 Fällen (52,3 %) erfolgte die Konditionierung ohne ATG. Tab. 5 gibt einen Überblick über die häufigsten Konditionierungen (Konditionierung bei ≥ 10 Patienten) der 262 Patienten.

Tab. 5: häufige Konditionierungen der Patienten

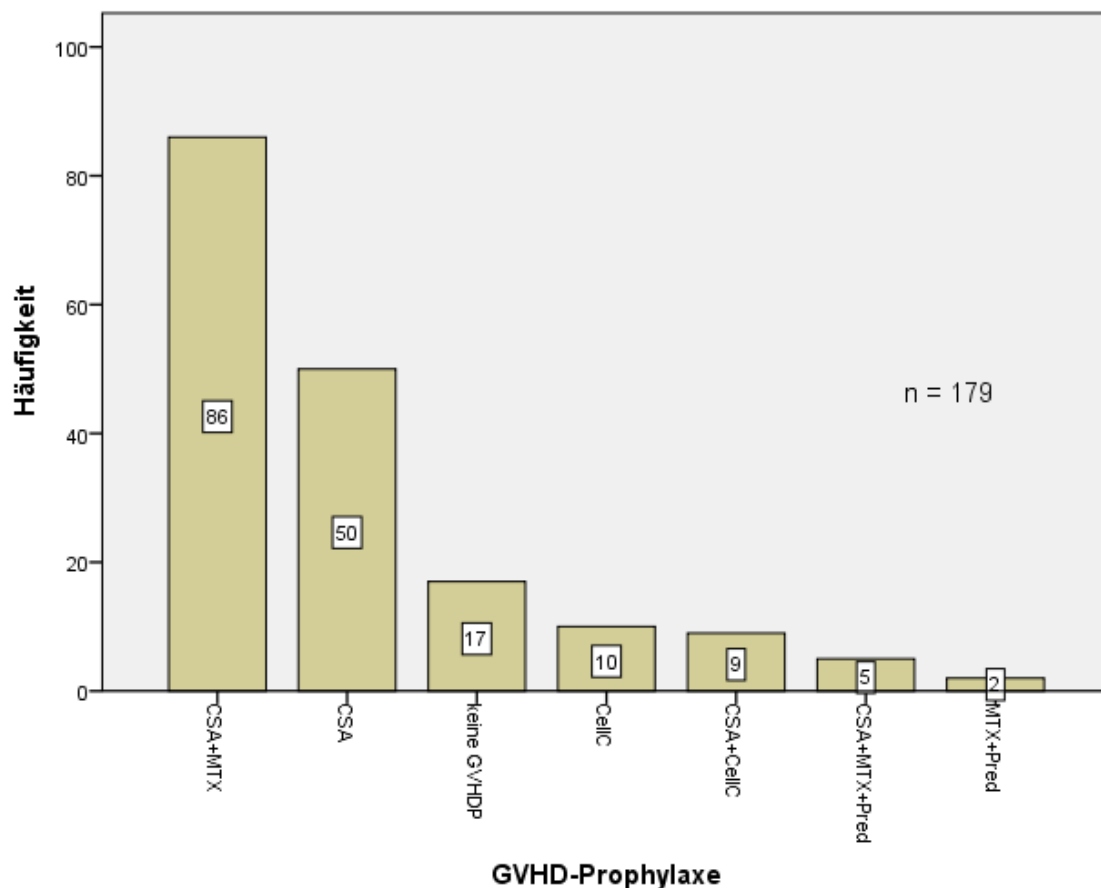
Konditionierung	Anzahl	Konditionierungsgruppe
VP16 MEL CBPT	30	1
BU CY	69	1
BU CY MEL	47	1
BU CY MEL ATG	39	1
BU MEL	12	1
OKT3 FLU TEPA MEL	12	1
FGY VP16 ATG	26	2
FGY VP16	14	2

Konditionierungsgruppe 1 = Chemotherapie Konditionierungsgruppe 2 = Radiochemotherapie FGY = fraktionierte Ganzkörperbestrahlung, BU = Busulfan, CY = Cyclo-phosphamid, VP16 = Etoposid, MEL = Melphalan, TEPA = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, CBPT = Carboplatin, OKT3 = Muromonab-CD3, FLU = Fludarabine

4.2.4 Prophylaxe der Graft-Versus-Host-Krankheit

Bei den 179 allogenen HSZTs wurde im Anschluss an die Transplantation eine medikamentöse Prophylaxe der GVHD durchgeführt, siehe Abb. 4. 86 Patienten der 179 allogenen transplantierten Patienten (48,0%) erhielten eine Kombination aus Cyclosporin A und Methotrexat, 50 Patienten (27,9 %) wurden ausschließlich mit Cyclosporin A behandelt. In 17 Fällen (9,5%) wurde keine GVHD-Prophylaxe verabreicht. Das Immunsuppressivum Mykophenolat-Motefil, zugelassen unter dem Namen CellCept®, wurde bei 10 Patienten (5,6%) als einziges Immunsuppressivum zur Prophylaxe verabreicht und bei 9 Patienten (5,0%) in Kombination mit Cyclosporin A. 5 weitere Patienten (2,8%) erhielten eine Kombination aus Cyclosporin A, Methotrexat und Prednisolon und 2 Patienten (1,1 %) wurden mit Methotrexat und Prednisolon behandelt.

Abb. 4: GVHD-Prophylaxe



CSA = Cyclosporin A, MTX = Methotrexat, CellC = Cellcept, PRED = Prednisolon

4.3 Nachweis von Adenoviren

Der Nachweis von ADV erfolgte bei den untersuchten Patienten des Universitätsklinikums Jena im Untersuchungszeitraum vom 01/1999 bis 10/2011 durch einen Nachweis des Virusgenoms mittels qualitativer PCR sowie einen Antigennachweis durch ELISA.

4.3.1 Klinische Proben

Die 262 Patienten nach HSZT wurden wöchentlich auf bestimmte Viren getestet, um im Falle einer Infektion schnell handeln zu können. Für das Adenoviruscreening wurden Proben von je 2,7 ml EDTA-Blut und 100 mg Stuhl per PCR und ELISA analysiert. Bei Verdacht auf eine Harnwegsinfektion wurden Urinproben per PCR ausgewertet. Nach dem ersten kritischen Zeitfenster (100 Tage) erfolgte das Screening monatlich oder nach Bedarf, je nach Ausprägung der GVHD oder der Menge der eingenommenen Immunsuppressiva. Die Diagnostik und Auswertung wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie am Universitätsklinikum Jena durchgeführt.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Standardmethode der molekularbiologischen Diagnostik, welche selektive DNA-Sequenzen in vitro exponentiell vervielfältigen kann, d.h. ohne einen Zwischenschritt in Bakterien. Zur Detektion von Adenoviren werden mittels PCR schon geringste Mengen der viralen DNA in wenigen Stunden nachgewiesen und vervielfältigt, sodass die PCR andere Nachweismethoden zunehmend verdrängt.

4.3.2.1 Desoxyribonucleinsäure-Extraktion

Vor der eigentlichen PCR erfolgte die DNA-Extraktion aus Blut- und Stuhlproben, Knochenmark, Abstrichen im Viruserhaltungsmedium, Liquor und respiratorischen Materialien mit dem QIAamp® Blood Mini Kit (Qiagen). EDTA-Blut, d.h. Vollblut wurde mit 2000 U/min 5min zentrifugiert und der Zentrifugationsüberstand, d.h. Plasma bzw. Serum, mit dem QIAamp® Blood Mini Kit, entsprechend den Instruktionen des Herstellers, behandelt. Im Folgenden wurde die Probe mittels 1 x 60 µl AE-Puffer eluiert. DNA aus Urinproben wurde mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit aufbereitet und mit 2 x 60 µl AE-Puffer eluiert. Die Lagerung der Eluate erfolgte bei -20 °C.

Der verwendete AE-Puffer von QIAamp® besteht aus:

- 10 mM Tris-Cl

- 0.5 mM EDTA; pH 9.0.

4.3.2.2 Die qualitative Polymerase-Kettenreaktion im Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena

Als Startmaterial benötigt man geringste Mengen viraler genomischer DNA, die auch ohne vorherige Reinigung, im Zelllysat verwendet werden kann. Zu dieser genomischen DNA werden kurze synthetische Oligonukleotide und eine hitzestabile DNA-Polymerase gegeben. Die Sequenz der synthetischen Oligonukleotide ist so beschaffen, dass sich ihre jeweiligen komplementären Sequenzen in der Ziel-DNA auf den gegenüberliegenden Strängen der Doppelhelix in einer Entfernung von einigen hundert bis wenigen tausend Basenpaaren befinden. Die Sequenz der nachzuweisenden Virus-DNA muss also vorab bekannt sein. Die PCR ist ein sich wiederholender dreischrittiger Prozess. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Hitzebehandlung in die einsträngige Form unter Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen. Der zweite Schritt erfolgt unter Temperatursenkung auf 50 °C. Die im Überschuss vorliegenden Oligonukleotide hybridisieren an ihren komplementären Sequenzen, sodass die DNA an diesen Stellen wieder doppelsträngig vorliegt (Annealing). Im dritten Reaktionsschritt erkennt die Taq-DNA-Polymerase, ein Replikationsenzym - gewonnen aus Mikroorganismen heißer Quellen (*Thermus aquaticus*) - die kurzen doppelsträngigen Abschnitte als Startsignale (Primer) und ergänzt die benachbarte einzelsträngige DNA komplementär in 5' → 3' Richtung mit freien Desoxynukleosidtriphosphaten zum Doppelstrang (extension). Der Zyklus ist beendet und es liegen zwei DNA-Doppelstränge vor. Durch eine Wiederholung der PCR-Zyklen im temperaturgesteuerten Thermocycler lässt sich so eine exponentielle Amplifikation der DNA zwischen den Oligonukleotiden erreichen. Im Allgemeinen werden 20-30 Zyklen durchlaufen und die so gewonnene Menge von DNA-Abschnitten wird danach mit herkömmlichen molekularbiologischen Verfahren weiterverarbeitet (Kulozik 2000, Oste 1988, Thiele 1991).

Im Uniklinikum Jena wurden für die qualitative PCR zum Nachweis der Adenovirussequenzen die Primer LC 1, LC 2, 11 A und 11 B verwendet, hergestellt von der Firma BioScience Jena (s. Tab. 6). In Ringversuchproben mit bekannter Virusmenge wurde, bei alleiniger Verwendung der Primer LC1 und LC2, der hAdV Typ 11 unterquantifiziert. In einer internen Studie des Uniklinikums Jena konnte als Ursache ein Mismatch in der Primerbindungsregion der Sequenz von Typ 11 für LC1 und LC2 identifiziert werden. Um dieses Problem zu beheben, wurden 2 zusätzliche Primerpaare 11A und 11B entwickelt, welche ein optimales Bindungsverhalten für HAdV Typ 11 vorweisen und zusätzlich zu LC1 und LC2 in den PCR-

Ansatz gegeben werden. Die durchgeführte qualitative PCR ist demnach zum Nachweis der Serotypen HAdV 1, HAdV 2, HAdV 3, HAdV 4, HAdV 5, HAdV 6, HAdV 7, HAdV 8, HAdV 11, HAdV 19, HAdV 20, HAdV 21, HAdV 22, HAdV 23, HAdV 24, HAdV 25, HAdV 26, HAdV 29, HAdV 31, HAdV 32, HAdV 33, HAdV 34, HAdV 35, HAdV 37, HAdV 40, HAdV 44, HAdV 45 und HAdV 46 geeignet (Putz 2009).

Tab. 6: Primer und Sequenzen der hAdV-PCR

Primer	Sequenz
LC 1 23 mer	5'- gCC ACg gtg ggg TTT CTA AAC TT
LC 2 23 mer	5'- gCC CCA gtg gtC TTA CAT gCA CAT C
11 A 25 mer	5'- gCC CCA ATg ggC ATA CAT gCA CAT C
11 B 23 mer	5'- gCT ACg gTg ggg TTT CTA AAC TT

Der Reaktionsansatz für den Thermocycler beinhaltete 5 µl der Probe und 45 µl des Mastermixes. Der Mastermix setzte sich für 1 PCR-Ansatz a 45 µl folgendermaßen zusammen:

- Diethylpyrocarbonat-Wasser 18,25 µl
- Q-Solution 10,0 µl
- 10 x Puffer mit MgCl₂ 5 µl
- d NTP – Mix Plus (10mM) Roche 1 µl
- MgCl₂ (25mM) 1,5 µl
- Primer LC1 (10µM) 2 µl
- Primer LC 2 (10µM) 2 µl
- Primer 11A (10µM) 2 µl
- Primer 11B (10µM) 2 µl
- Hot-Taq-Polymerase 0,25 µl
- Uracil-DNA-Glycosylase 1.0 µl

Der Mastermix a 45 µl und die Probe a 5 µl wurden in 5 ml Probenröhrchen gegeben, zentrifugiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und gemeinsam mit der Positiv- und Negativkontrolle im Thermocycler T3000 der Firma Biometra (Göttingen) bearbeitet. Dafür wurde das Cyclerprogramm 52 angewählt. Als Positivkontrolle wurde ein linearisiertes Referenzplasmid pGEM HAdV mit einem Insert eines Teils der HAdV-2 Hexonregion-Sequenz eingesetzt (Heim et al. 2003). Als Negativkontrolle wurde mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser verwendet, um eventuelle kontaminierende Ribonukleasen zu inaktivieren. Diethylpyrocarbonat ist ein Ester der Pyrokohlensäure und kann Ribonukleasen inaktivieren,

indem es kovalent am stärksten an Histidin, sowie an Lysin, Cystein und Thyrosin bindet (Chirgwin et al. 1979). Der genaue Ablauf dieser sog. Hot-Start-PCR ist in Tab. 7 dargestellt. Bei einer Hot-Start-PCR beginnt die Polymerisation erst bei einer gewünschten Mindesttemperatur, hier 95 °C. Bei dieser Mindesttemperatur sind die Primer sicher an die spezifische DNA-Sequenz gebunden, die Entstehung unspezifischer Nebenprodukte reduziert sich und die Spezifität der Methode steigt.

Tab. 7: PCR-Zyklen

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur
1	15 min	95 °C
34	30 sec	94 °C
	30 sec	55 °C
	1 min	72 °C
1	4 min	72 °C
-	∞	4 °C

Gerade bei der qualitativen PCR stellt die Kontamination mit Fremd-DNA ein erhebliches Problem dar, da wegen der geringen Ausgangsmengen der DNA in der Probe schon minimale Kontaminationen zu extremen Ergebnisverfälschungen führen. Fremd-DNA kann u.a. über Pipetten, Reaktionsgefäße, Reagentien, Personal oder die Arbeitsgeräte übertragen werden (cross contamination). Außerdem können Plasmide kontaminiert sein und geklonte Sequenzen der Ziel-DNA enthalten (plasmid contamination). Eine weitere bedeutende Kontaminationsart ist die sog. Carry-over-Kontamination, welche besonders in Laboratorien auftritt, die wiederholt den gleichen Erreger nachweisen, wobei es zu Verunreinigungen durch ein PCR-Produkt einer vorangegangenen PCR kommen kann. Eventuelle Verunreinigungen und resultierende falsch-positive Ergebnisse bei einer hot-start-PCR können relativ unkompliziert durch den Zusatz von 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat (dUTP) statt 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP) und des Enzyms Uracil-N-Glycosylase verhindert werden. In vivo katalysiert die Uracil-DNA-Glycosylase die Spaltung eines Uracilbausteins vom Zuckerphosphatrückrat der DNA. Durch diesen Reparaturmechanismus werden Uracilreste aus der DNA geschnitten, welche durch eine Desaminierung von Cytosin, z.B. durch UV-Strahlung oder durch Einwirkung bestimmter Chemikalien entstanden sind. Wenn nun in der PCR bei der Amplifikation dUTP statt dTTP eingebaut wird, enthält das PCR-Produkt in beiden Strängen

Uracil-Reste und unterscheidet sich so von jeder neuen Ausgangs-DNA. Bevor eine neue PCR begonnen wird, wird der PCR-Ansatz für 2 Minuten auf 50 °C erhitzt. Dabei entfernt die Uracil-N-Glykosylase alle Uracil-Reste aus DNA-Molekülen, die in einem vorangegangenen Zyklus synthetisiert wurden und den neuen PCR-Ansatz kontaminieren. Im ersten Erhitzungsschritt der hot-Start-PCR (15 Minuten bei 95 °C) wird die Uracil-N-Glykosylase inaktiviert und das Phosphatrückrat der kontaminierenden DNA an den Stellen ohne Base gespalten (Longo et al. 1990). In Tab. 8 werden weitere Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen beschrieben, welche für die durchgeführten Messungen Voraussetzung waren.

Tab. 8: Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen der qualitativen PCR

Maßnahmen	Beschreibung
Steriles Arbeiten	<ul style="list-style-type: none"> - Tragen von Einmalhandschuhen - sterile Arbeitsplätze (Bestrahlung zwischen den Ansätzen mit UV-Licht) - aliquotierte Reagentien - Reinigung und Bestrahlung der Reaktionsgefäße
Arbeiten in verschiedenen Räumen	<ul style="list-style-type: none"> - Vorbereitung und Nachbereitung der PCR in getrennten Räumlichkeiten
Verwendung geeigneter Pipetten	<ul style="list-style-type: none"> - Verwendung verschiedener Pipetten für jeden einzelnen Arbeitsschritt - Sterilisation der Spitzen mit γ-Strahlung
Verwendung von Negativkontrollen	<ul style="list-style-type: none"> - Einsatz von mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser als Negativkontrolle - nach PCR (Negativkontrolle und Mastermix) durfte kein Produkt nachweisbar sein
UV-Licht	<ul style="list-style-type: none"> - Zerstörung kontaminierender DNA durch UV-Licht vor einer neuen PCR

4.3.3 Agarose-Gelelektrophorese der viralen Desoxyribonucleinsäure

Die PCR-Produkte werden mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und detektiert, um sie anschließend durch den Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe als hAdV-DNA einzustufen oder im Falle keiner Übereinstimmung einen negativen Nachweis von AdV zu erbringen. Bei der Agarose-Gelelektrophorese durchlaufen Nukleinsäurestränge ein Agarosegel, welchem ein elektrisches Feld anliegt, auf dessen Pluspol sich die negativ geladenen DNA-Stränge zubewegen. Ziel hierbei ist die Auftrennung der Makromoleküle, in diesem Fall DNA-Fragmente, nach Größe und Ladungsdichte. Größere Teilchen bewegen sich hierbei langsamer durch das Agarosegel aufgrund eines erhöhten Reibungswiderstands. Makromoleküle mit höherer Ladungsdichte haben eine erhöhte Beschleunigung im elektrischen

Feld und bewegen sich dadurch schneller (Jansohn 2012). Im Institut für Medizinische Mikrobiologie erfolgen die Nachweise der Amplifikate nach Auftrennung im 2%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid. Zu je 2 µl Ladepuffer werden 10 µl Amplifikat der Proben, 10 µl Amplifikate der Positiv- und Negativkontrolle sowie 10 µl DNA-Marker 9 in die einzelnen Geltaschen gegeben. Der DNA-Marker dient als Größenstandard, da er aus DNA-Fragmenten bekannter Größen besteht. Anhand der Laufgeschwindigkeit des Markers und der bekannten Größe in Basenpaaren, kann die genaue Größe der Amplifikate unter Einbeziehung deren Laufgeschwindigkeit im Agarosegel berechnet werden. Dann wird die Gelelektrophorese 50 min bei 90 V durchgeführt und anschließend im Molecular Imager Gel Doc XR der Firma BIO-RAD fotografiert. Bei einer positiven Adenovirusprobe befinden sich spezifische Banden bei 281 Basenpaaren.

4.3.4 Nachweis von Adenoviren durch Enzymimmunassay Ridascreen®

Stuhlproben der Patienten wurden wöchentlich oder bei Auftreten von gastrointestinalen Symptomen mit dem Enzymimmunassay Ridascreen® auf AdV getestet. Dabei handelt es sich um ein Sandwichverfahren, bei dem monoklonale Antikörper gegen das Hexon-Antigen von AdV eingesetzt werden. Die zu untersuchende Stuhlprobe wird als Suspension in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, an deren Oberfläche ebenfalls die biotynilierten monoklonalen Antikörper gegen das Hexon-Protein gebunden sind (Konjugat 1). Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur (20-25°C) und einem Waschschrift wird Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) hinzugegeben und erneut inkubiert. Sind AdV in der Probe vorhanden, bildet sich ein Sandwichkomplex aus immobilisierten Antikörpern, den Adenovirusantigenen und den mit dem Biotin-Streptavidin-Poly-Peroxidase-Komplex konjugierten Antikörpern. Ein weiterer Waschschrift entfernt überschüssiges Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat, bevor durch Zugabe von Substrat -bei positiven Proben - ein blauer Farbumschlag detektiert werden kann. Danach erfolgt eine 15-minütige Inkubation der Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Reaktion wird mit Hilfe eines Stopp-Reagenz (stop) beendet, welches einen Farbumschlag von blau nach gelb bewirkt. Nach vorsichtigem Mischen wird die Extinktion bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Bei jeder Testdurchführung sind, zum Zweck der Qualitätssicherung, die Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, welche über korrekte Testdurchführung und Stabilität der Reagenzien Auskunft geben. Der Test ist korrekt verlaufen und somit gültig, wenn der Extinktionswert der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 und der gemessene Extinktionswert der Positivkontrolle bei 450 nm größer als 0,8 ist. Vor der Auswertung wird der Grenzwert festgelegt, indem zur gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,15

Extinktionseinheiten hinzuaddiert werden (Cut-off = Extinktionswert der Negativkontrolle + 0,15). Eine Probe wird als positiv gewertet, wenn ihr Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Grenzwert liegt. Liegt der Extinktionswert im Bereich von 10 % über oder unter dem errechneten Grenzwert, ist diese Probe als grenzwertig zu beurteilen und der Test muss wiederholt werden. Ist bei einer Wiederholung mit einer frischen Stuhlprobe das Ergebnis erneut grenzwertig, ist diese Probe als negativ einzustufen (R-Biopharm AG 2005).

Reagenzien und Geräte:

- Reagenzienkit RIDASCREEN der Firma R-biopharm (Inhalt s. Tab. 9: Packungsinhalt Ridascreen® Adenovirus Kit)
- destilliertes Wasser
- Probenröhrchen
- Pipettenspitzen
- Mikropipetten für 50-100 µl und 1 ml Volumina
- Vortex Mixer
- Messzylinder 1000 ml
- Kurzzeitwecker
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 nm)
- Zellstoff
- Abfallbehälter

Tab. 9 Packungsinhalt Ridascreen® Adenovirus Kit

Bestandteil	Menge	Erklärung
Plate	96 Bestimmung	Mikrotitrierplatte, 12 Mikrotitrierstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen AdV
Diluent 1	100 ml	Probenverdünnungspuffer, Protein-gepufferte Na-Cl-Lösung; gebrauchsfertig, blau gefärbt
Wash	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10fach konzentriert); enthält 0,1 % Thimerosal
Control +	2 ml	Positivkontrolle; inaktivierte Adenoviruskultur; gebrauchsfertig
Control -	2 ml	Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer); gebrauchsfertig
Conjugate 1	13 ml	Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper gegen AdV in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; grün gefärbt
Conjugate 2	13 ml	Streptavidin-Poly-Peroxidase Konjugat in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; orange gefärbt
Substrate	13 ml	Wasserstoffperoxid/Tetramethylbenzidin; gebrauchsfertig
Stop	8 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

4.4 Statistische Methoden

Die dieser Dissertation zugrundeliegende Statistik wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller-Universität Jena erarbeitet. Die verwendeten Patientendaten stammen aus Akten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena. Aus den Akten des Institutes für Medizinische Mikrobiologie stammen die Daten über die PCR- und ELISA- Nachweise der AdV. Der Einfluss von AdV-Infektionen auf das Überleben des gesamten Patientenkollektivs konnte in der Kaplan-Meier-Schätzung grafisch dargestellt werden und im Log-Rank-Test, als nicht-parametrischen Test zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben, auf Signifikanz getestet werden. In der

Gruppe der Patienten mit AdV-Infektion konnte der Einfluss von verschiedenen Therapiemöglichkeiten ebenfalls durch die Kaplan-Meier-Schätzung in Verbindung mit dem Log-Rank-Test ausgewertet werden. Das Ergebnis wurde als statistisch signifikant anerkannt bei einem $p < 0,05$.

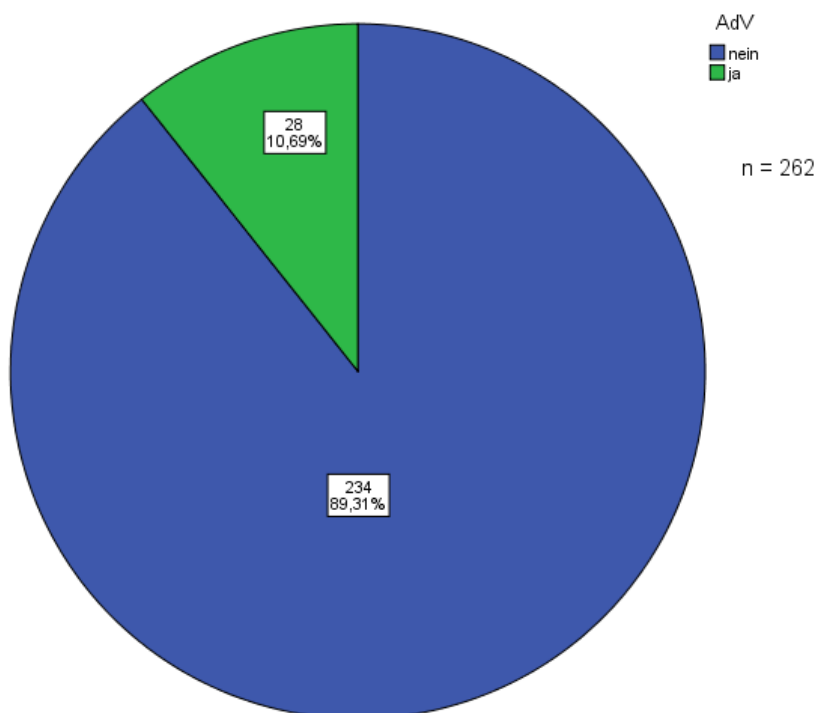
Um die vermuteten Risikofaktoren auf ein unterschiedliches Outcome bezüglich Auftreten einer AdV-Infektion bzw. Letalität einer AdV-Infektion zu prüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit durchgeführt. Hierbei wurde zum einen das Gesamtpatientenkollektiv und zum anderen die Gruppe mit AdV-Infektion in verschiedene Risikogruppen bezüglich des Alters, Geschlechts, der Transplantationsart, des Spendertyps, des Einflusses der Konditionierung, des Vorhandenseins und Schweregrads einer GVHD und der Anzahl der positiv getesteten Materialien eingeteilt. Bei einem $p < 0,05$ konnte der Risikofaktor als signifikant angesehen werden. Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Diagramme und Kaplan-Meier-Kurven erfolgten mit dem Programm SPSS 20.0. Zur primären Datenerfassung und zum Erstellen der Tabellen wurde das Programm Microsoft Office Excel 2013 verwendet. Bei dem verwendeten Literaturprogramm zur Erstellung des Literaturverzeichnisses handelt es sich um Citavi 5. Die Texterstellung erfolgte mit Microsoft Office Word 2013.

5 Ergebnisse

5.1 Merkmale einer Adenovirusinfektion

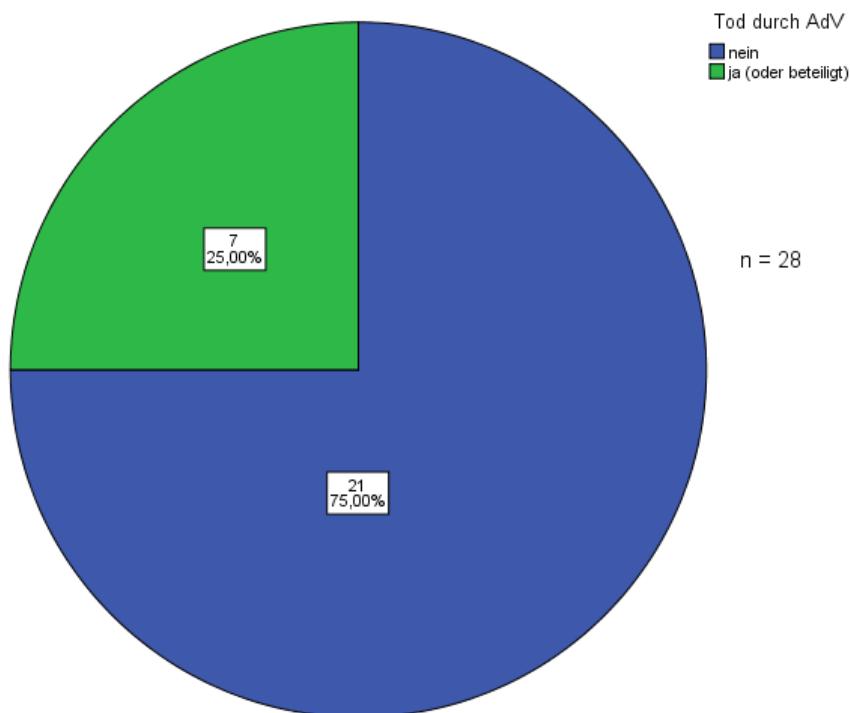
Im Zeitraum von Januar 1999 bis November 2011 wurden in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena bei 262 Kindern eine HSZT durchgeführt. Die Patienten erhielten bis zum Tag 100 nach Transplantation wöchentlich EDTA-Blutuntersuchungen auf mögliche AdV mittels qualitativer PCR. Im untersuchten Zeitraum konnten nach einer HSZT bei 28 von 262 Patienten (10,7 %) AdV nachgewiesen werden (s. Abb. 5).

Abb. 5: Anzahl der Patienten mit AdV-Infektion



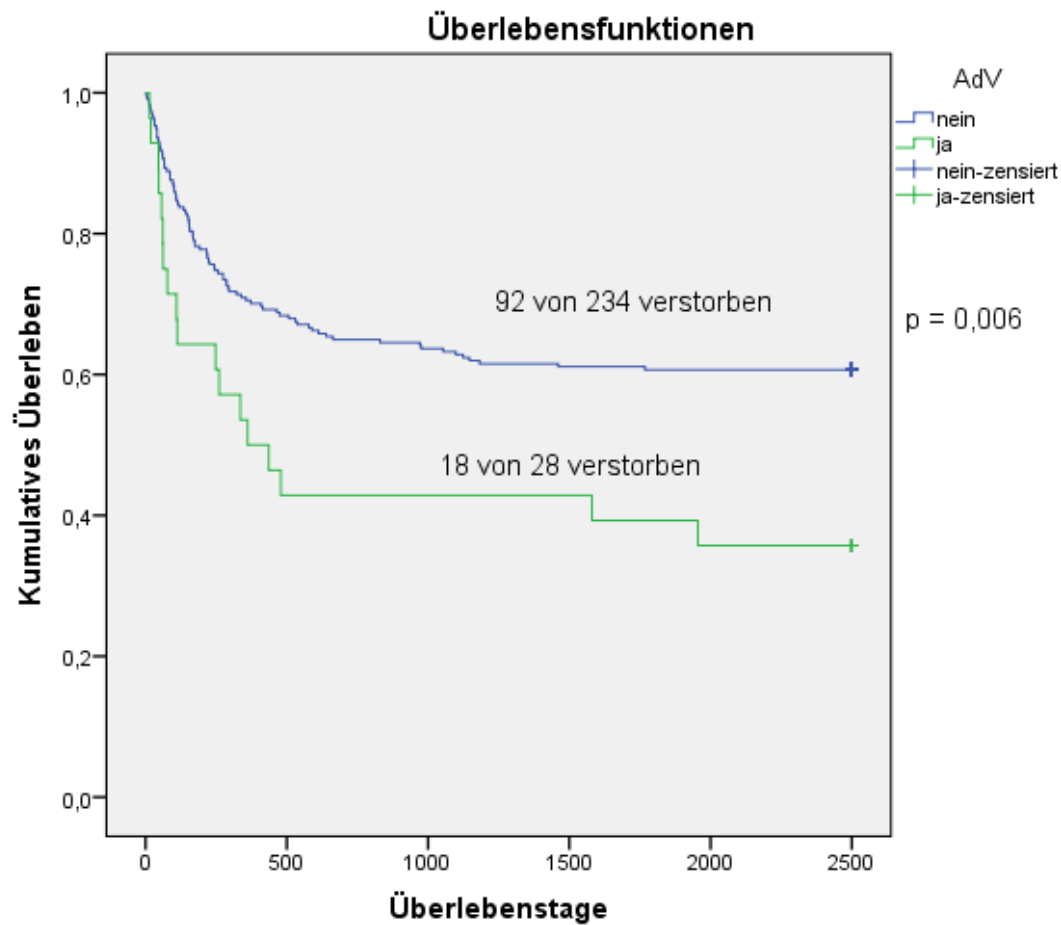
Von 28 Patienten mit nachgewiesenen AdV starben 7 Patienten (25,0 % und 2,67 % des gesamten Patientenkollektivs) an der AdV-Infektion oder an den unmittelbaren Folgen (s. Abb. 6, Tab.3). Zum Todeszeitpunkt wurde bei diesen Kindern AdV im Blut nachgewiesen, oft auch in anderen Materialien wie z.B. Stuhl oder Trachealsekret.

Abb. 6: letale Ausgänge von Patienten mit AdV



Der Vergleich der Überlebenszeiten, dargestellt in der Kaplan-Meier-Kurve, zeigt signifikante Unterschiede im Überleben zwischen den Patienten mit und ohne AdV-Infektion (s. Abb. 7). Dabei eingeschlossen sind alle Todesursachen, also neben einer letalen AdV-Infektion auch das Versterben an der Grunderkrankung. Die Überlebenswahrscheinlichkeit an Tag 20 nach HSZT beträgt in der Gruppe mit AdV-Infektion 92,9 % und bei den Nicht-Infizierten 97,4%, nach 100 Tagen liegt die Wahrscheinlichkeiten zu Überleben bei 71,4% vs. 86,8%, nach 200 Tagen 64,3% vs. 77,8%, nach 300 Tagen 57,1% vs. 71,8%. Die Überlebenswahrscheinlichkeit am Ende des Untersuchungszeitraums beläuft sich auf 35,7% bei Kindern mit AdV-Infektion und 60,7% in der Gruppe ohne AdV. Diese Unterschiede werden sowohl graphisch gut sichtbar und auch in allen verwendeten statistischen Verfahren als signifikant getestet ($p = 0,006$ im log Rank Test). Nach HSZT versterben signifikant häufiger Patienten, welche eine AdV-Infektion aufweisen.

Abb. 7: Überleben bei Patienten mit und ohne AdV



Die Symptome der AdVE sind vielfältig je nach Nachweisort und können von leichter Gastroenteritis bis zu schwerer Gastroenteritis mit blutigen Stühlen, Pneumonie, Enzephalitis und Hepatitis ausgeprägt sein. Tab. 10 zeigt einen Überblick der 28 Patienten mit positivem AdV-Nachweis sowie deren Symptome.

Tab. 10: Nachweisorte von Symptome einer AdV-Infektion

Patient	Nachweisort	Symptome	Tod durch AdV
G.S.	Stuhl, Urin, Blut, Tubussekret	Gastroenteritis, Hepatitis	ja
K.S.	Stuhl, Rachenschleimhautbiopsie	Gastroenteritis	nein
H.S.	Urin, Blut, Tubussekret	hämorrhagische Zystitis	ja
S.E.	Stuhl, Urin, Blut, Tubussekret, Rachenspülwasser, Magensekret, Aszites, Knochenmark, Lebergewebe	Gastroenteritis, Hepatitis, Zystitis, Knochenmarkdepression	ja
W.S.	Stuhl, Blut, Urin, Rachenspülwasser	Gastroenteritis	ja
K.S.	Stuhl, Urin, Blut, Rachenspülwasser	Hämorrhagische Zystitis	nein
U.K.	Stuhl	Gastroenteritis	nein
M.M.	Stuhl	Gastroenteritis	nein
S.J.	Stuhl	Gastroenteritis	nein
L.A.	Rektalabstrich	Gastroenteritis	nein
G.S.	Stuhl, Rektalabstrich, Urin, Blut, Magensekret, Tubussekret	Gastroenteritis, hämorrhagische Zystitis	ja
K.S.	Stuhl, Urin, Bläscheninhalt, Rachenabstrich	Gastroenteritis	nein
K.S.	Urin, Blut	Zystitis	nein
B.C.	Urin, Blut, Knochenmark	Hämorrhagische Zystitis, Knochenmark-depression	ja
R.S.	Urin, Blut	Hämorrhagische Zystitis	nein
P.T.	Stuhl, Rektalabstrich, Urin, Blut, Magensekret	Gastroenteritis	nein
G.C.	Urin, Blut	Zystitis	nein
R.A.	Stuhl, Urin, Blut, Rachenspülwasser	Gastroenteritis, hämorrhagische Zystitis	nein
A.P.	Stuhl, Urin, Blut	Gastroenteritis	nein
P.F.	Stuhl, Urin, Blut, Rachenspülwasser, Liquor	Gastroenteritis, Enzephalitis	ja
O.M.	Stuhl, Blut, Rachenspülwasser	Gastroenteritis	nein
E.L.	Stuhl, Urin, Blut	Gastroenteritis	nein
S.G.	Stuhl	Gastroenteritis	nein
H.I.	Stuhl, Urin, Blut	Gastroenteritis	nein
G.A.	Stuhl, Urin, Sputum	Gastroenteritis	nein
B.F.	Blut, Biopsien Lunge, Pankreas, Leber, Kolon	Gastroenteritis, Hepatitis, Pneumonie	nein
D.F.	Urin, Biopsien Gastrointestinaltrakt	Gastroenteritis	nein
B.A.	Stuhl, Urin, Blut	Gastroenteritis	nein

In der Gruppe der an AdV erkrankten Patienten konnten die Viren in unterschiedlichen Materialien festgestellt werden. Am häufigsten erfolgte der Adenovirusnachweis durch PCR im EDTA-Blut (s. Abb. 8) und im Urin (s. Abb. 9), bei jeweils 19 von 28 Patienten (67,86%). In den Stuhlproben wurden durch ELISA (s. Abb. 10) bei 13 von 29 Patienten AdV nachgewiesen (44,8%) und in der PCR (s. Abb. 11) bei 16 von 29 (55,2%). Weitere Nachweisorte von AdV waren die oberen Atemwege. Positive Proben wurden in Tubussekret, Rachenschleimhautbiopsien und Rachenspülwasser und Rachenabstrichen bei 9 von 29 Patienten (31 %) getestet. Bei einer generalisierten AdV-Infektion befielen die Viren multiple Organe und konnten auch an schwer erreichbaren Orten wie Liquor, Knochenmark und Lebergewebe vereinzelt nachgewiesen werden.

Abb. 8: AdV-Nachweis im Blut

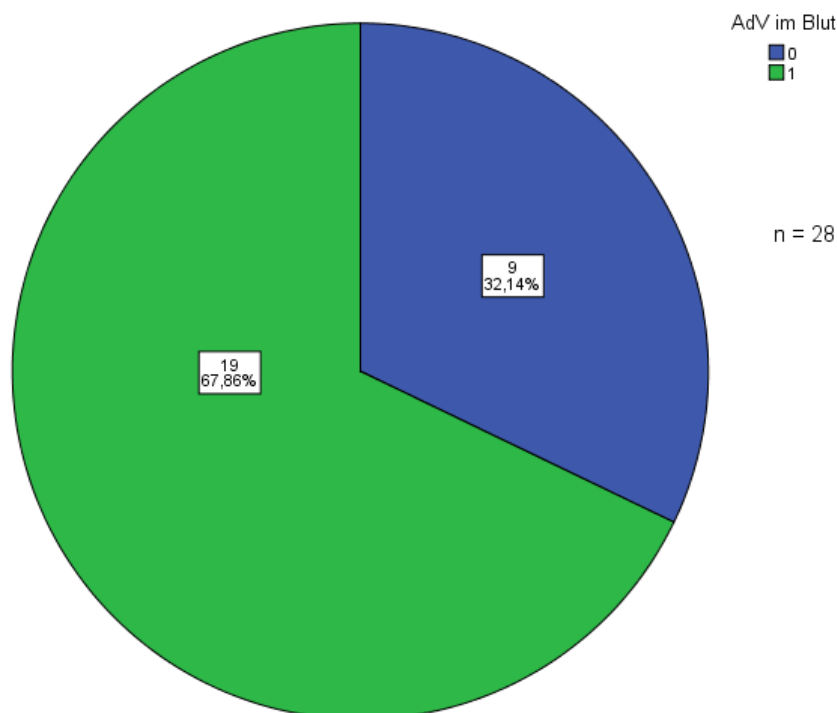


Abb. 9: AdV-Nachweis im Urin

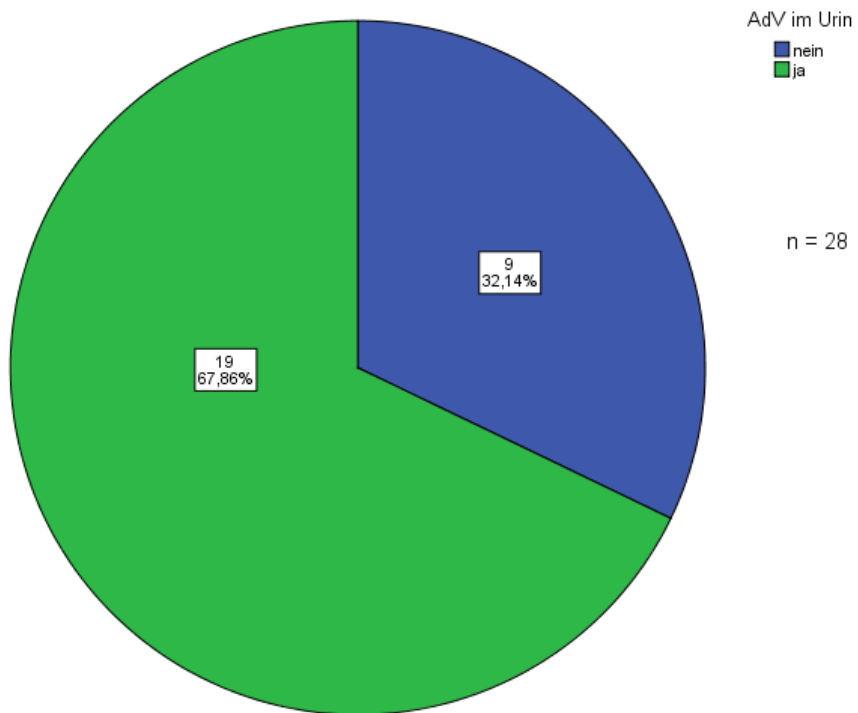


Abb. 10: AdV-Nachweis im Stuhl durch ELISA

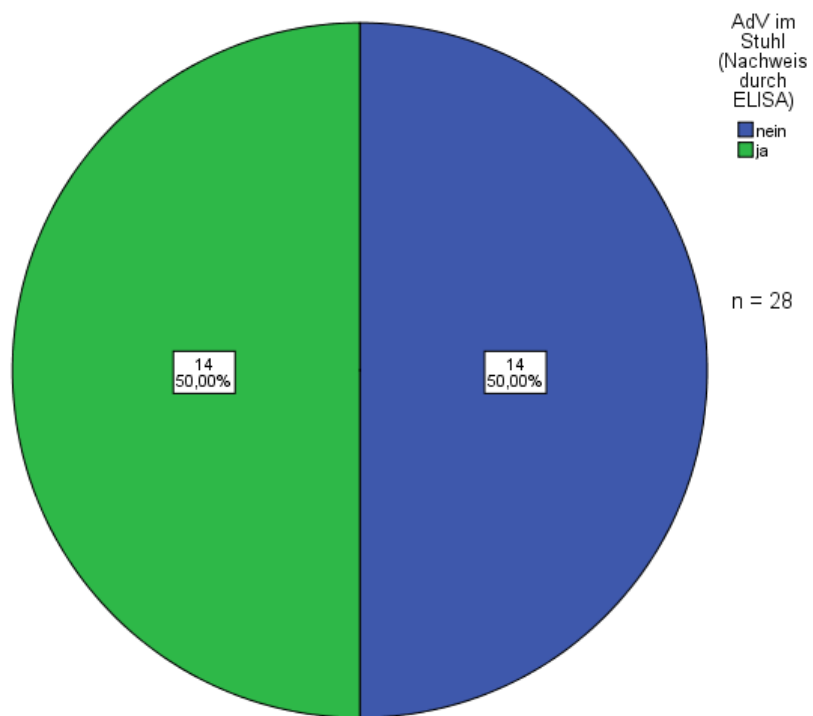
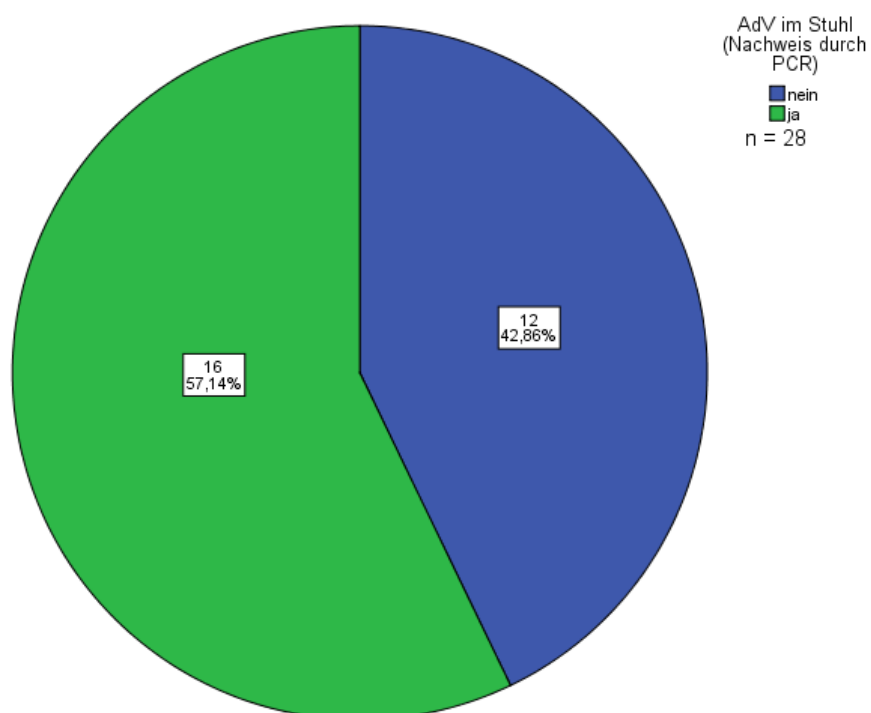
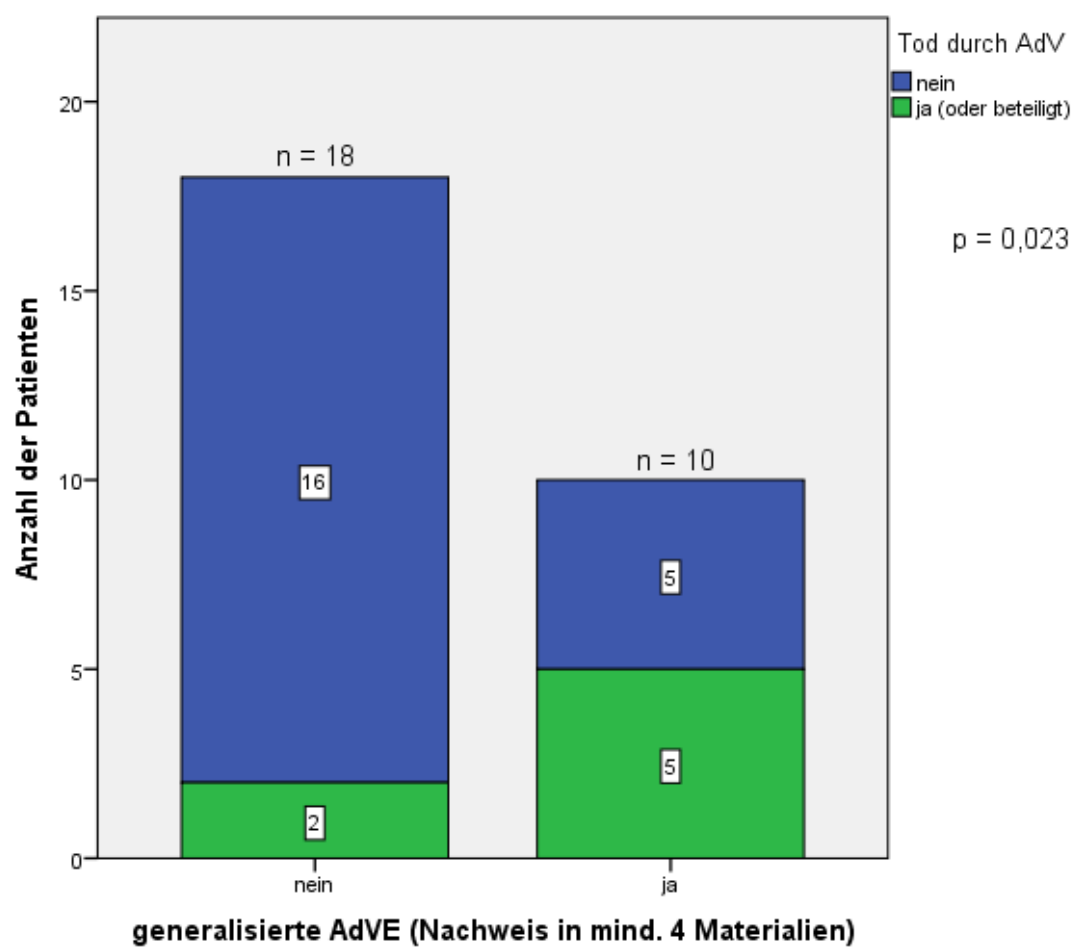


Abb. 11: AdV-Nachweis im Stuhl durch PCR



Wenn in mehr als 3 Materialien, z.B. in Blut, Urin, Stuhl und Tubussekret AdV nachgewiesen wurden, kann man von einer generalisierten AdV-Infektion ausgehen. Dies betraf 10 von 262 Kinder nach HSZT (3,8 %) und 10 von 28 Kinder nach HSZT mit positivem Nachweis von AdV (35,7 %). Mit Hilfe einer Kreuztabelle und dem Chi-Quadrat-Test konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einem generalisierten Virenbefall signifikant häufiger an der Adenovirusinfektion sterben ($p = 0,023$, s. Abb. 12, Tab. 11). Bei den Patienten, bei denen keine generalisierte Infektion aufgetreten ist, starben 2 von 18 Patienten an AdV (11,1%). In der Patientengruppe mit Adenovirusnachweis in mindestens 4 Materialien starben 5 von 10 Patienten (50%). Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt ebenfalls einen signifikanten Verlauf (s. Abb. 13). Die Überlebenswahrscheinlichkeit bei einem Auftreten der AdV an 4 und mehr Orten beträgt nach 100 Tagen 50,0%, bei einer nicht generalisierten oder keiner AdV-Infektion 86,5%. Daraus kann geschlossen werden, dass ein multiples Auftreten von AdV an verschiedenen Orten mit einer schweren AdVE mit signifikant erhöhter Sterberate (unter Einschluss aller Todesursachen) gleichzusetzen ist.

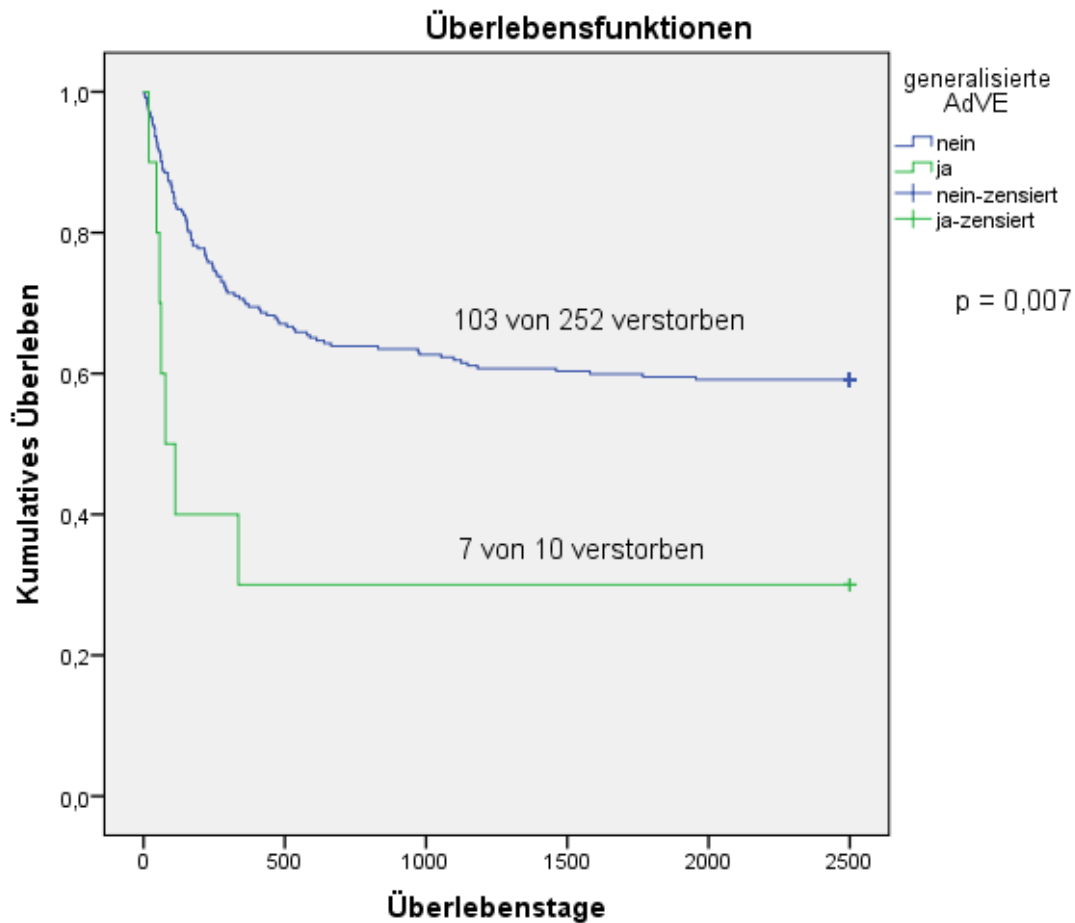
Abb. 12: generalisierte AdV-Infektion und Letalität



Tab. 11: Kreuztabelle mit den Variablen AdV in 4 oder mehr Materialien und Letalität

p = 0,023			AdV-Infektion letal		Gesamt
			nicht letal	letal	
AdV in > 3 Materialien	nein	Anzahl	16	2	18
		%	88,9%	11,1%	100,0%
	ja	Anzahl	5	5	10
		%	50%	50%	100,0%
Gesamt		Anzahl	21	7	28
		%	75,0%	25,0%	100,0%

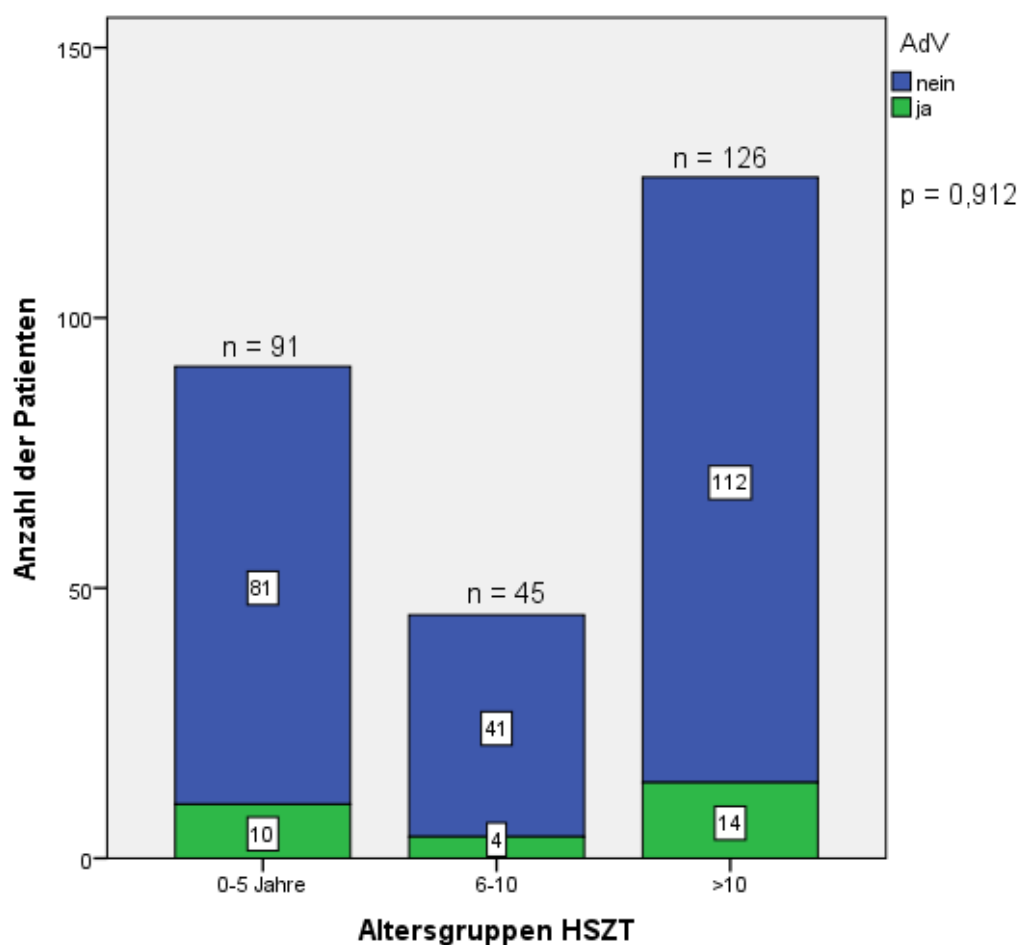
Abb. 13: Überleben bei AdV in > 3 Materialien



5.2 Einfluss des Alters und des Geschlechts

Das mediane Alter der 262 Kinder, die im Untersuchungszeitraum eine HSZT erhielten, betrug 10 Jahre und das mittlere Alter 9,63 Jahre. Bei der statistischen Auswertung in verschiedenen gruppierten Altersklassen konnte kein signifikanter Zusammenhang erwiesen werden. In der Altersgruppe von 0-5 Jahre konnten bei 10,9 % AdV nachgewiesen werden, in der Altersgruppe von 6-10 Jahren 8,8% und in der Gruppe der über 10-jährigen 11,1 % (s. Abb. 14, Tab. 11). Eine Adenovirusreaktivierung, die eventuell zu einer AdVE führt, kann also in jedem Alter auftreten.

Abb. 14: Anzahl der Patienten mit AdV in klassierten Altersgruppen

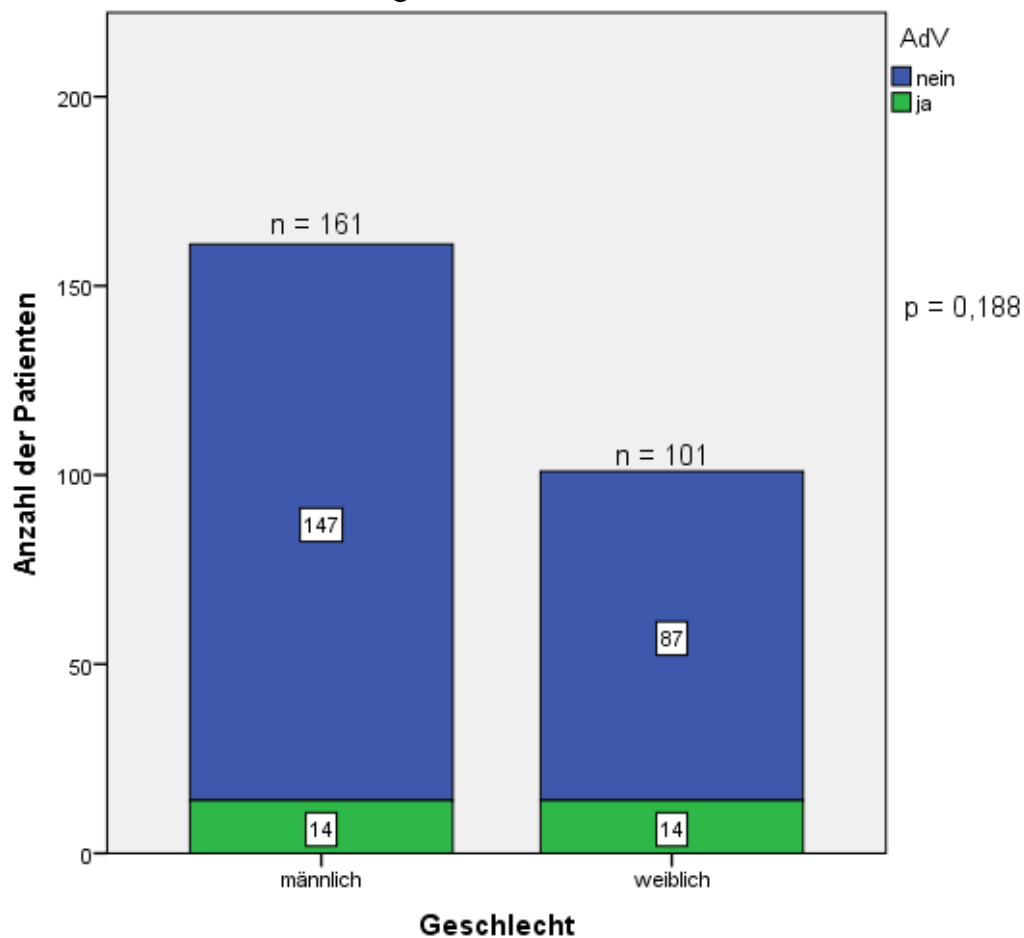


Tab. 12: Kreuztabelle für die Variablen Altersklasse (klassiert) und AdV

p = 0,912			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Alter an HSZT(Klassiert)	0-5 Jahre	Anzahl	81	10	91
		%	89,0%	11,0%	100,0%
	6-10	Anzahl	41	4	45
		%	91,1%	8,9%	100,0%
	>10	Anzahl	112	14	126
		%	88,9%	11,1%	100,0%
Gesamt		Anzahl	234	28	262
		%	89,3%	10,7%	100,0%

Von den 161 transplantierten Jungen erkrankten 14 (8,7%) an AdV; von den 101 Mädchen erkrankten 14 (13,9 %) nach der HSZT. Der Chi-Quadrat-Test ergab keine signifikante Abhängigkeit der AdV-Infektion vom Geschlecht der Patienten (s. Abb. 15, Tab. 13)

Abb. 15: Patienten mit AdV aufgeteilt nach Geschlecht



Tab.13: Kreuztabelle für die Variablen Geschlecht und AdV

p = 0,188			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Geschlecht	männlich	Anzahl	147	14	161
		%	91,3%	8,7%	100,0%
	weiblich	Anzahl	87	14	101
		%	86,1%	13,9%	100,0%
Gesamt		Anzahl	234	28	262
		%	89,3%	10,7%	100,0%

5.3 Einfluss der Transplantationsart

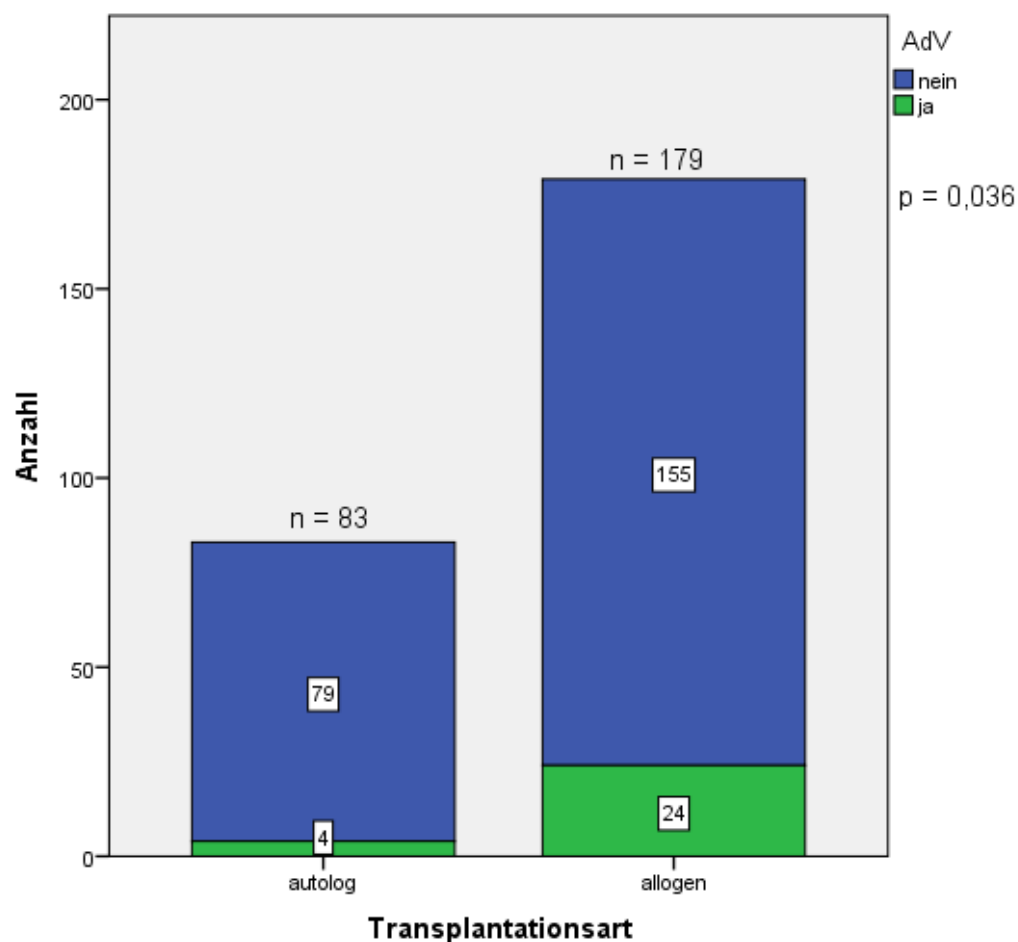
Von den Patienten, die eine autologe HSZT erhielten, erkrankten von 83 Patienten 4 an AdV (4,8%), bei den Patienten mit allogener HSZT erkrankten von 179 Patienten 24 an AdV (13,4

%). In der untersuchten Patientengruppe erkrankten signifikant mehr Kinder an einer AdV-Infektion nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation ($p = 0,036$, s. Tab. 14, Abb. 16).

Tab. 14: Kreuztabelle mit den Variablen Transplantationsart und AdV

p = 0,036			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Transplantations- art	autolog	Anzahl	79	4	83
		%	95,2%	4,8%	100,0%
	allogen	Anzahl	155	24	179
		%	86,6%	13,4%	100,0%
Gesamt		Anzahl	234	28	262
		%	89,3%	10,7%	100,0%

Abb. 16: Patienten mit AdV aufgeteilt nach Transplantationsart



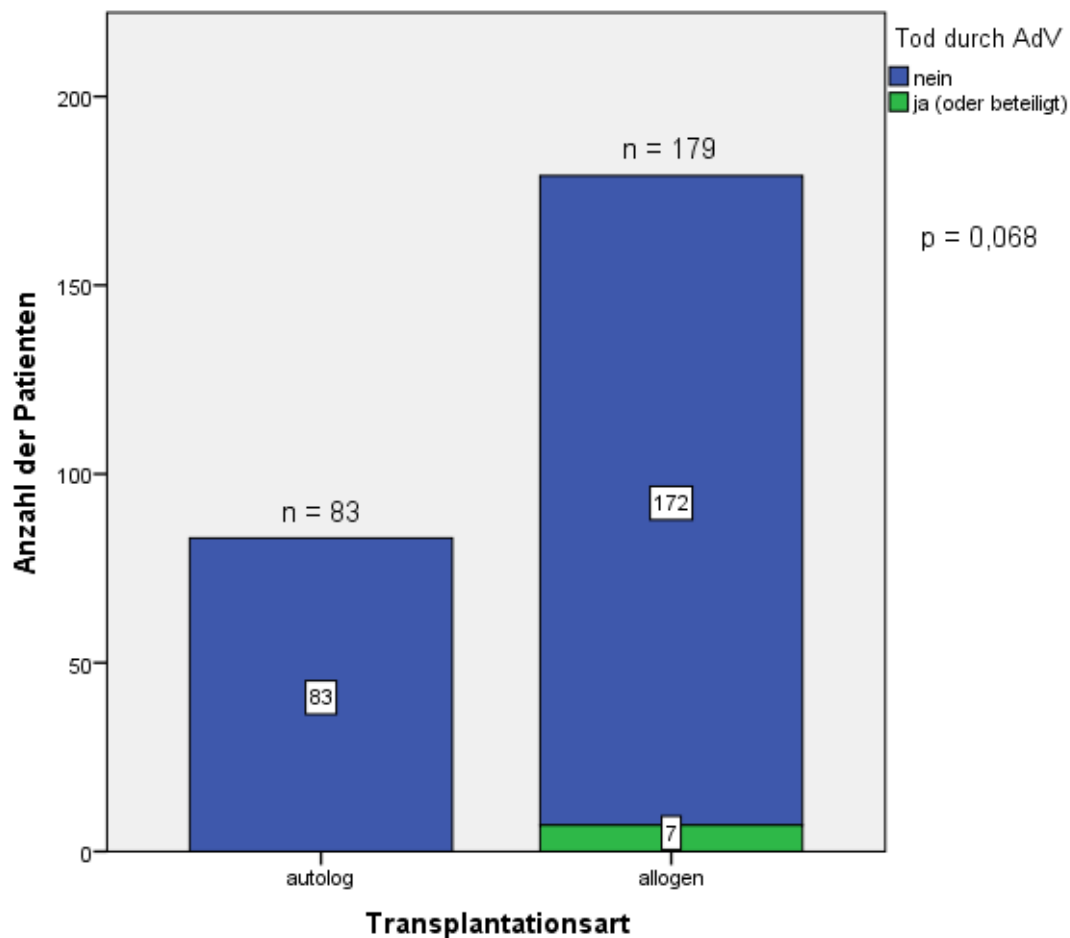
Des Weiteren untersucht meine Arbeit AdV-Infektionen mit letalem Ausgang. Bei den 83 Kindern, die autolog transplantiert wurden, gab es keinen Todesfall, der durch AdV verursacht wurde. In der Patientengruppe der allogenen Transplantierten verstarben 7 von 179 Kindern in

Folge einer AdV-Infektion (s. Tab. 15, Abb. 17). Nicht bei allen Verstorbenen waren AdV die alleinige Todesursache, aber ein bedeutender Faktor, der letztendlich zum Multiorganversagen und dadurch zum Tod führte. Der Zusammenhang zwischen Transplantationsart und letalem Ausgang der AdV-Infektion konnte nicht signifikant nachgewiesen werden ($p = 0,068$).

Tab. 15: Kreuztabelle mit den Variablen Transplantationsart und Tod durch AdV

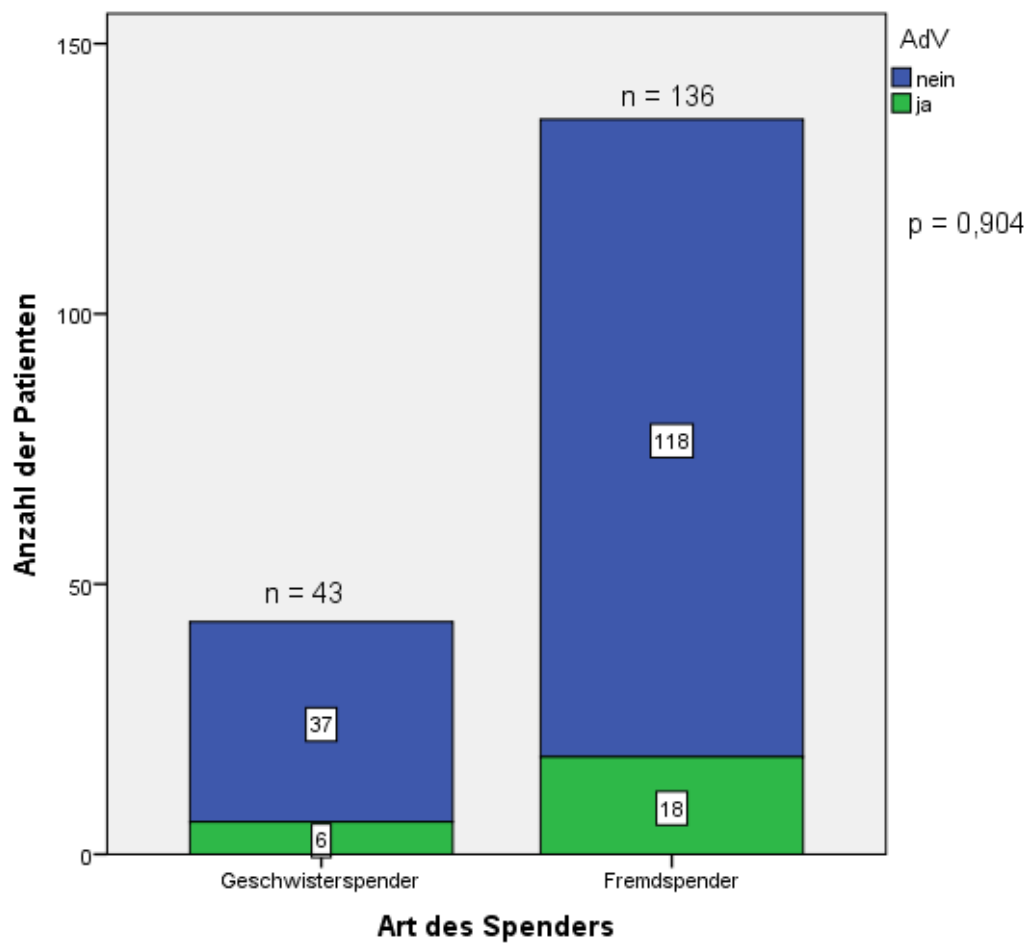
p = 0,068			Tod durch AdV		Gesamt
			nein	ja (oder beteiligt)	
Transplantations- art	autolog	Anzahl	83	0	84
		%	100%	0,0%	100,0%
	allogen	Anzahl	172	7	179
		%	96,1%	3,9%	100,0%
Gesamt		Anzahl	255	7	262
		%	97,3%	2,7%	100,0%

Abb. 17: letale AdV-Infektion aufgeteilt nach Transplantationsart



Innerhalb der Gruppe der allogene transplantierten Patienten wurde untersucht, ob der Spendertyp, also Geschwister- oder Fremdspender, einen Einfluss auf eine Reaktivierung der AdV beim Patienten hat. Dies ist nicht der Fall, da die Erkrankungsraten in beiden Gruppen ähnlich hoch sind. Bei den Patienten, die einen Geschwisterspender hatten, erkrankten 14,0 % an AdV und bei den Patienten mit Fremdspender 13,2 % ($p = 0,904$), s. Abb. 18, Tab. 16. Auch die Unterscheidung der gespendeten Stammzellen, nach HLA-identischen und haploidentischen Stammzellspenden, erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. Der Grad der HLA-Identität einer Stammzellspende hat keinen Einfluss auf eine vermehrte Reaktivierung von AdV. So erkrankten von 133 Patienten mit HLA-identischen Spendern 18 (13,5%) an AdV und von 45 haploidentisch transplantierten Patienten 6 (13,0 %), s. Tab. 17.

Abb. 18: Patienten mit AdV aufgeteilt nach Art des Spenders



Tab. 16: Kreuztabelle mit den Variablen Art des Spenders (Geschwister- oder Fremdspender) und AdV

p = 0,904			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Art des Spenders	Geschwisterspender	Anzahl	37	6	43
		%	86,0%	14,0%	100,0%
	Fremdspender	Anzahl	118	18	136
		%	86,8%	13,2%	100,0%
Gesamt		Anzahl	155	24	179
		%	86,6%	13,4%	100,0%

Tab. 17: Kreuztabelle mit den Variablen Art des Spenders (HLA- identisch oder nicht) und AdV

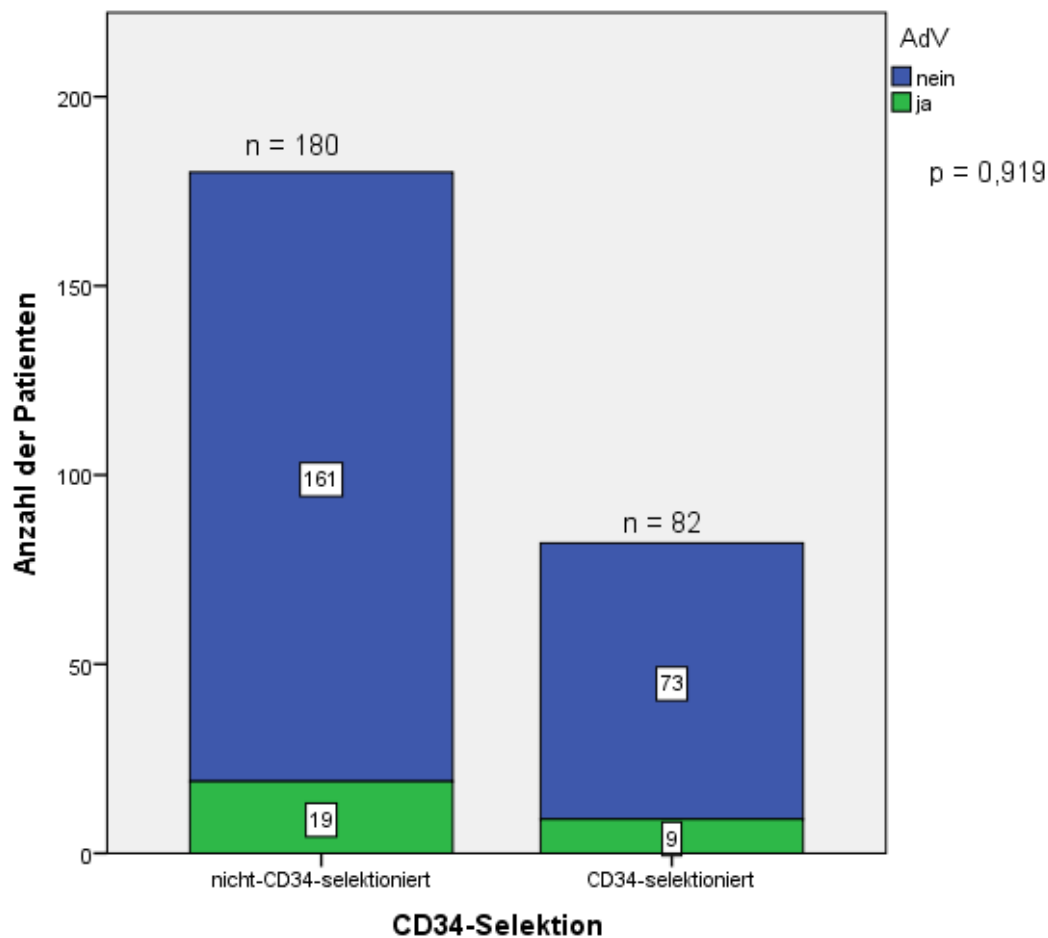
p = 0,933			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Spender HLA-identisch	ja	Anzahl	115	18	133
		%	86,5%	13,5%	100,0%
	nein	Anzahl	40	6	45
		%	87,0%	13,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	155	24	178
		%	86,6%	13,4%	100,0%

Bei 83 Patienten wurden die gespendeten Stammzellen mittels Leukapherese aufgereinigt und die so selektionierten CD34 + Stammzellen transplantiert. Untersucht wurde, ob die durch das Verfahren indirekte T-Zell-Depletion einen Einfluss auf die Adenovirusreaktivierung hat. In der Gruppe der nicht CD-34-selektionierten Stammzellen erkrankten 19 von 180 Patienten (10,6 %) und in der Gruppe der CD34-selektionierten Stammzellspenden erkrankten 9 von 82 Patienten (11,0 %) an AdV. Mittels Chi-Quadrat-Test ist dieses Ergebnis nicht signifikant ($p = 0,919$), s. Tab. 18, Abb. 19.

Tab. 18: CD-34-Selektion und AdV

p = 0,919			AdV		Gesamt
			nein	ja	
CD34Selektion	nicht selektioniert	Anzahl	161	19	180
		%	89,4%	10,6%	100,0%
	CD34 selektioniert	Anzahl	73	9	82
		%	89,0%	11,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	234	28	262
		%	89,3%	10,7%	100,0%

Abb. 19: CD-34-Selektion und AdV



5.4 Einfluss der Konditionierung

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Konditionierung im Vorfeld an die HSZT einen Einfluss auf die Reaktivierung von AdV hat. Dazu wurde der Einsatz verschiedener Medikamente anhand von Kreuztabellen nach Auftreten einer Adenovirusreaktivierung ausgewertet, s. Tab. 19-22. Bei keiner der durchgeführten Statistiken konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden. Da alle Konditionierungsarten auf das Knochenmark myeloablativ wirken und die Immunabwehr des Patienten bis zum Anwachsen des Spendermarks nicht vorhanden bzw. extrem geschwächt ist, können vorhandene AdV reaktivieren. Die Medikamente sind unterschiedlich aggressiv, aber auch die milderen Konditionierungsvarianten reichen aus eine Reaktivierung auszulösen.

Tab. 19: Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung mit Busulfan und AdV

p = 0,390			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Busulfan	nein	Anzahl	151	16	167
		%	90,4%	9,6%	100,0%
	ja	Anzahl	80	12	92
		%	87,0%	13,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	231	28	259
		%	89,2%	10,8%	100,0%

Tab. 20: Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung mit Cyclophosphamid und AdV

p = 0,264			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Cyclophos- phamid	nein	Anzahl	142	14	156
		%	91,0%	9,0%	100,0%
	ja	Anzahl	91	14	105
		%	86,7%	13,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	233	28	261
		%	89,3%	10,7%	100,0%

Tab. 21: Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung durch Bestrahlung und AdV

p = 0,246			AdV		Gesamt
			nein	ja	
Bestrahlung	nein	Anzahl	181	19	201
		%	90,0%	9,5%	100,0%
	ja	Anzahl	52	9	61
		%	85,2%	14,8%	100,0%
Gesamt		Anzahl	233	28	261
		%	89.3%	10.7%	100.0%

Tab. 22: Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung mit ATG und AdV

p = 0,908			Adenovirusinfektion		Gesamt
			nein	ja	
ATG	nein	Anzahl	124	13	137
		%	90,5%	9,5%	100,0%
	ja	Anzahl	110	15	125
		%	88,0%	12,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	234	28	262
		%	89,3%	10,7%	100,0%

5.5 Einfluss der Graft-Versus-Host-Krankheit

Eine wichtige Rolle für die weitere Patientengeschichte nach einer HSZT spielt das Auftreten einer GVHD. Ob diese auch das Auftreten oder die Letalität einer Adenovirusreaktivierung beeinflusst, wird im Folgenden untersucht. Da eine GVHD nur bei allogenen Transplantierten auftreten kann, wurden die autolog transplantierten Patienten von den Betrachtungen ausgeschlossen. Vergleicht man die AdV-Infektion je nach Auftreten einer GVHD, gibt es keine signifikanten Unterschiede. Von 83 Patienten, die eine GVHD erlitten, waren gleichzeitig 12 Patienten mit AdV infiziert (14,5 %). In der Vergleichsgruppe ohne GVHD konnten bei 12 von 89 Patienten AdV nachgewiesen werden (12,5 %). Das Auftreten von einer GVHD und eine Adenovirusreaktivierung sind also unabhängig voneinander (s. Tab. 23).

Tab. 23: Kreuztabelle mit den Variablen GVHD und AdV

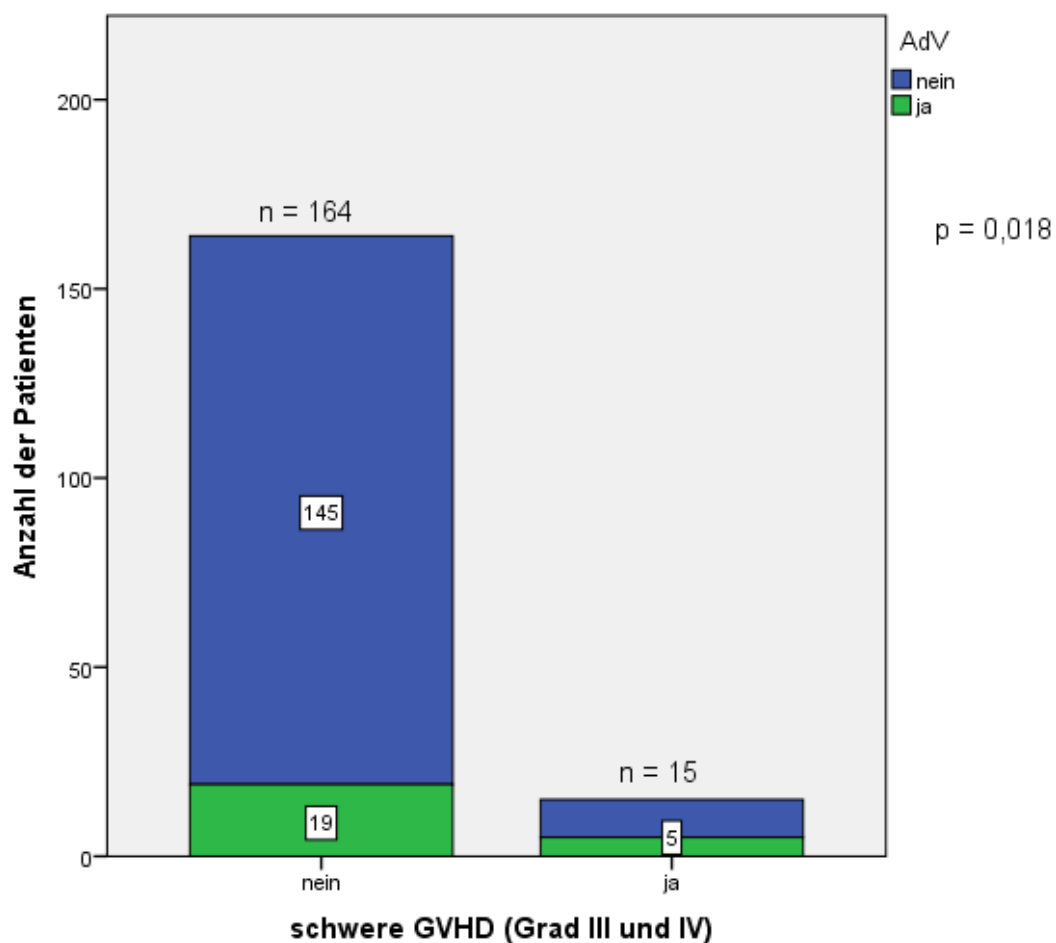
p = 0,701			AdV		Gesamt
			nein	Ja	
GVHD	nein	Anzahl	84	12	89
		%	87,5%	12,5%	100,0%
	ja	Anzahl	71	12	83
		%	85,5%	14,5%	100,0%
Gesamt		Anzahl	155	24	179
		%	86,6%	13,4%	100,0%

Bezieht man den Schweregrad der GVHD in die Untersuchung mit ein, ergibt sich ein anderes Bild. Bei der schweren Form der GVHD (Grad III und IV), bei der Haut, Darm und Leber in hohem Maß betroffen sind, beträgt die Nachweisrate von AdV 33,3 %, wohingegen diese bei Patienten ohne GVHD oder milder GVHD (Grad I-II) bei 11,6 % liegt (s. Tab. 24, Abb.20). Eine schwere GVHD Grad III und IV geht signifikant häufiger mit einer Adenovirusreaktivierung einher ($p = 0,018$).

Tab. 24: Kreuztabelle mit den Variablen schwere GVHD und AdV

p = 0,018			AdV		Gesamt
			nein	Ja	
GVHD Grad III und IV	nein	Anzahl	145	19	164
		%	88,4%	11,6%	100,0%
	ja	Anzahl	10	5	15
		%	66,7%	33,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	155	24	179
		%	86,6%	13,4%	100,0%

Abb. 20: Zusammenhang schwere GVHD und AdV

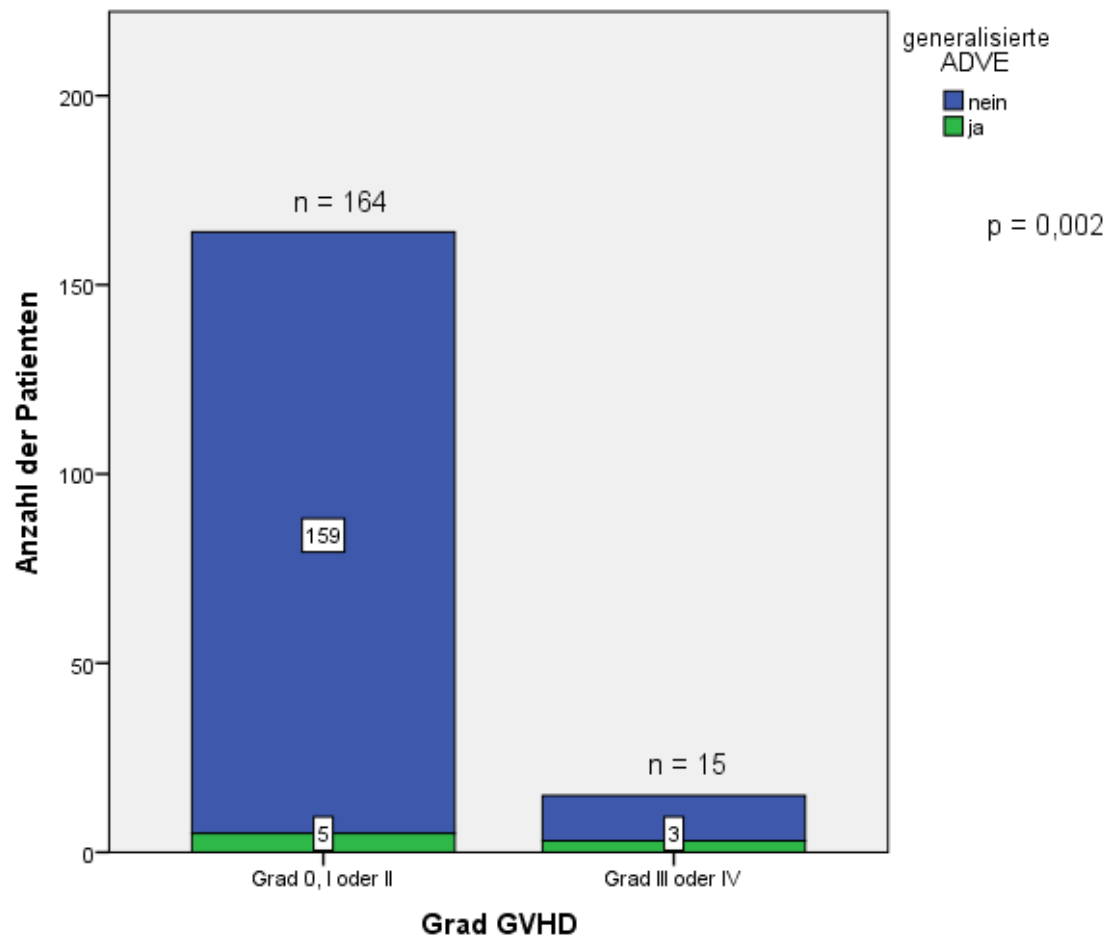


Bei den Untersuchungen zu den verschiedenen Nachweisorten von AdV konnte festgestellt werden, dass eine AdV-Infektion besonders häufig letal verläuft, wenn sie an mehr als 3 unterschiedlichen Orten nachweisbar ist und somit eine generalisierte AdVE vorliegt. Bei der Auswertung dieser schweren Adenovirusverläufe und der Patienten mit schwerer GVHD (Grad III und IV) konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (s. Tab. 25, Abb. 21). Bei einer schweren GVHD hatten 20,0% der Patienten auch eine generalisierte AdV-Infektion, bei keiner GVHD oder einer milderen Form erkrankten nur 3,0 % der Patienten an einer generalisierten AdV-Infektion ($p = 0,002$).

Tab. 25: Kreuztabelle mit den Variablen schwere GVHD und generalisierte AdV-Infektion

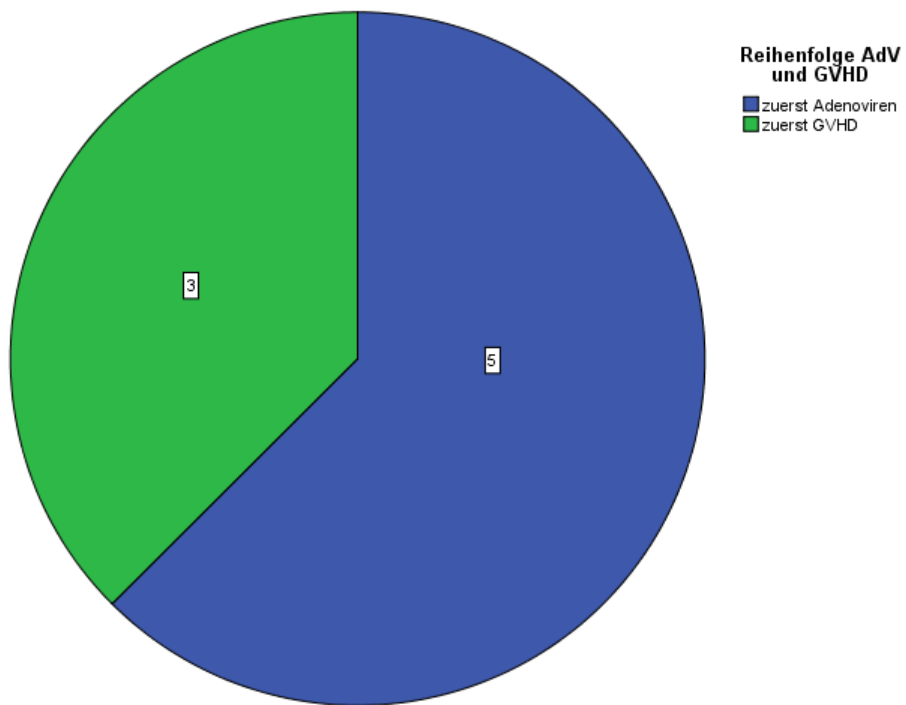
p = 0,002			AdV an mehr als 3 Orten		Gesamt
			nein	Ja	
GVHD III und IV	nein	Anzahl	159	5	164
		%	97,0%	3,0%	100,0%
	ja	Anzahl	12	3	15
		%	80,0%	20,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	171	8	179
		%	95,5%	4,5%	100,0%

Abb. 21: Zusammenhang schwere GVHD und generalisierte AdV-Infektion



Die Reihenfolge, in der eine Adenovirusreaktivierung und eine GVHD auftreten, ist zufällig. Bei 5 Patienten erfolgte zuerst die AdV-Infektion und bei 3 Patienten trat vorher eine GVHD auf (s. Abb. 22)

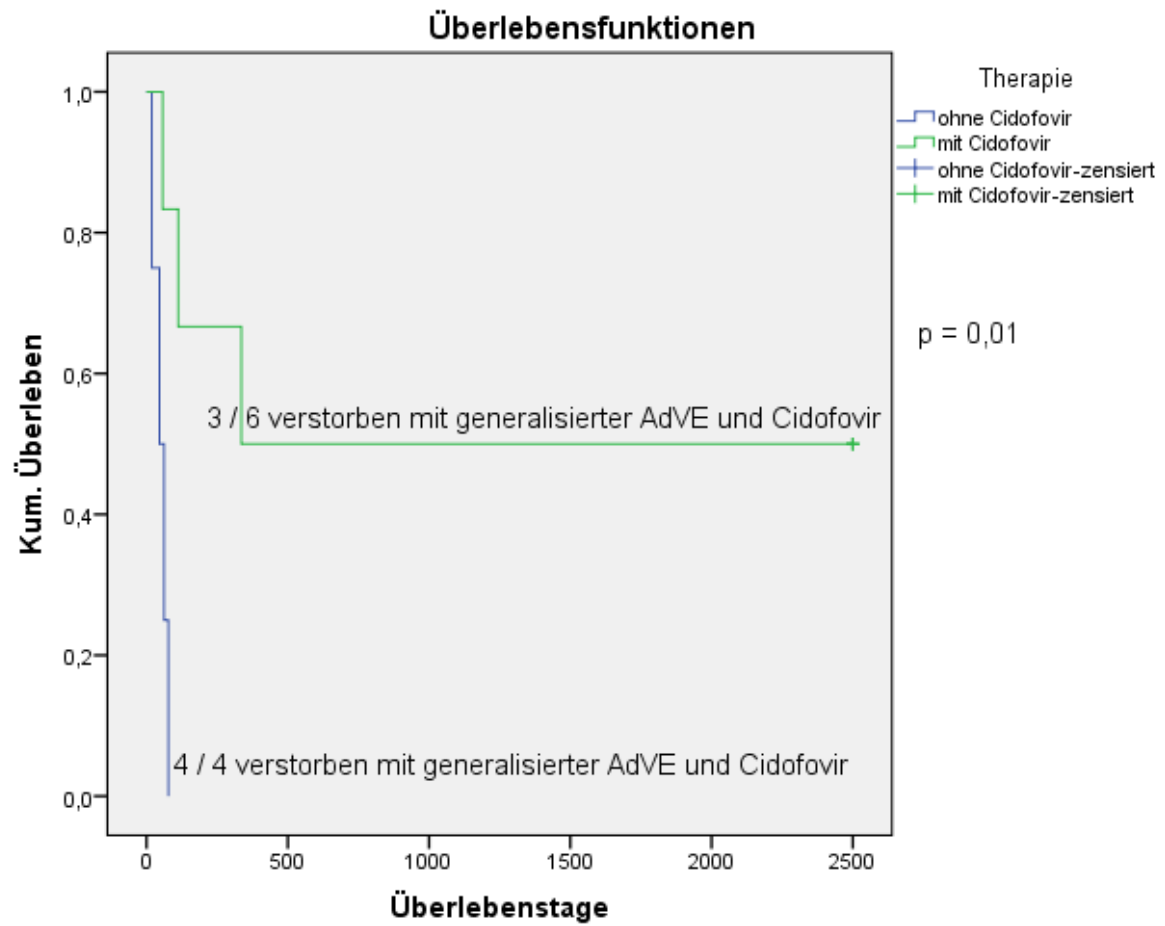
Abb. 22 Reihenfolge AdV und GVHD



5.6 Einfluss der Therapie

Den richtigen Zeitpunkt für den Start einer Therapie zu finden, scheint nach Studium der Patientenakten nicht immer einfach und eindeutig gewesen zu sein. Da eine AdV-Infektion, wenn sie erst im ganzen Körper generalisiert vorliegt, in meiner Patientengruppe zu 50 % tödlich verlief (s.o.), ist eine funktionierende Therapie überlebenswichtig. Da aber die Medikamente Ribavirin und Cidovofir starke Nebenwirkungen haben und die ohnehin durch die Grunderkrankung und HSZT geschwächten Patienten weiter belasten, erfolgte der Therapiestart bei Einzelnachweisen oft zögerlich oder gar nicht. Patienten mit einer generalisierten AdV-Infektion mit einem Adenovirusnachweis an mehr als 3 Orten wurden in der Überlebenszeitanalyse untersucht. Bei diesen Patienten mit generalisierter schwerer AdV-Infektion unterscheidet sich das Überleben signifikant, je nach Therapie mit Cidofovir ($p = 0,01$). Bei Patienten, die mit Cidofovir therapiert worden, betrug die Überlebenswahrscheinlichkeit zum Ende des Untersuchungszeitraums 50 %, im Gegensatz zu einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 0 % bei Patienten ohne Therapie oder mit anderen Virustatika. Das Hinzunehmen aller an AdV erkrankten Patienten lieferte kein signifikantes Ergebnis, da die Gruppe ohne Therapie, gemischt ist aus Patienten mit Einzelnachweisen von AdV, bei denen keine Symptome auftraten und das Nichttherapieren keine Auswirkungen auf den Patientenverlauf hatte und Patienten, welche nicht therapiert worden sind und eine schwere AdVE erlitten und an dieser verstarben.

Abb. 23: Überleben bei Patienten mit generalisierter AdV-Infektion je nach Cidofovirtherapie



5.7 Exemplarischer Patientenverlauf

Kasuistik Patient F.P.

Bei dem 6-Jährigen F.P. wurde im September 2004 eine Fanconi-Anämie diagnostiziert. Nach einer Konditionierung mit Fludarabin, Cyclophosphamid und ATG „rabbit“ Fresenius sowie einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung erfolgte im Juli 2007 eine allogene Knochenmarktransplantation. Im September 2007 erkrankte F.P. an einer akuten Epstein-Barr-Virus-Infektion. Im Oktober 2007 musste die Diagnose eines Myelodysplastischen Syndroms gestellt werden, welches zunächst mit Azacytidin und danach mit einem reduzierten Induktionstherapieblock mit Cytarabin und Idarubicin behandelt wurde. Im Dezember 2007 erhielt er einen CD34⁺-selektierten Stammzellboost der primären Fremdspenderin, woraufhin eine Remission erzielt werden konnte. Im Verlauf entwickelte sich eine akute GvHD mit Haut-, Magen-Darm-Trakt- und Leberbeteiligung. Durch die starke Immunsuppression, die zur Behandlung der ausgeprägten GvHD nötig war, kam es zu einer Reaktivierung von BK-Viren, welche im Urin und Blut nachgewiesen werden konnten. Im Februar 2008 erhielt F.P. einen weiteren Block Azacytidin und blieb bezüglich des Myelodysplastischen Syndroms in Remission. Im März 2008 ergab die Knochenmarkpunktion ein hypoplastisches Knochenmark mit deutlichen Dysplasiezeichen in der Erythropoese, so dass er am 06.03.08 einen weiteren Stammzellboost der Spenderin erhielt. Zu diesem Zeitpunkt gab es keinen Anhalt für eine GvHD, es konnte auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet werden. Am 11.03.08 traten erneut Symptome einer akuten GvHD des Magen-Darm-Trakts und ein Anstieg der Leberenzyme auf. F.P. erhielt daraufhin eine Prednisolontherapie, die im Verlauf um CellCept, Cyclosporin A und schließlich Alemtuzumab erweitert wurde. Am 03.04.08, nach der 3. Infusion Alemtuzumab, trat bei F.P. ein generalisierter Krampfanfall auf, das Schädel-MRT zeigte eine neu aufgetretene bilaterale Diffusionsstörung ohne Zeichen einer Gefäßbeteiligung oder Liquorzirkulationsstörung. Der Liquor war klar und wies keinen pathologischen Befund auf. Die Enzephalopathie wurde als Nebenwirkung des Cyclosporin A eingestuft und die Therapie der GvHD mit Cellcept, Dexamethason und Photophoresen fortgeführt. F.P. Bewusstseinslage besserte sich und die Stuhlfrequenz nahm ab. Im April 2008 entwickelte F.P. einen Herpes Zoster mit anschließender Zosterneuralgie. Auch wurden am 14.04.2008 erstmals AdV in der Stuhl-PCR nachgewiesen. Am 14.05. erfolgte der Adenovirusnachweis im Blut und im Urin und ab dem 15.05 erfolgte eine Therapie mit Ribavirin - 30 Tage nach dem ersten Virusnachweis. Am 19.05. ergab eine Kontroll-Lumbalpunktion eine starke Blut-Liquor-Schrankenstörung. Am 19.05. und 20.05.2008 verschlechterte sich der Zustand des Patienten

dramatisch. Er hatte eine massive Darmblutung mit einem geschätzten Blutverlust von 1 l und wechselte zwischen somnolenten und komatösen Phasen. Außerdem entwickelte er ein Mittelhirnsyndrom. Ab dem 22.05.2008 blieb F.P. komatös und musste aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz intubiert und beatmet werden. Er begann zu fiebern. Trotz Ribavirin-Therapie waren die Nachweise in Blut, Stuhl und Urin weiter positiv, so dass nun eine generalisierte AdVE bestand. Am 26.05. 2008 traten im Trachealsekret ebenfalls AdV auf. Außerdem waren nun auch Rotaviren und BK-Viren wieder nachweisbar. Daraufhin wurde eine zusätzliche Cidofovirtherapie eingeleitet, welche F.P. am 23.05., 30.05., und 06.06.2008 erhielt. Ebenfalls zur Therapieintensivierung der Adenovirusinfektion wurde die Gabe von antigenspezifischen T-Zellen der Knochenmarkspenderin geplant. Nachdem in Tübingen die eingeschickte Probe der kryokonservierten Stammzellen positiv für ADV-spezifische T-Zellen getestet wurde, erfolgte am 04.06. die Transfusion der Zellen. Am 09.06.2008 zeigte F.P. das Bild einer Sepsis und einer hämorrhagischen Enzephalitis. Der Liquor war nun ebenfalls positiv für AdV. Seine Pupillen waren groß und lichtstarr und die EEG-Ableitung ergab ein Null-Linien-EEG. Nach ausführlicher Hirntoddiagnostik wurde am 13.06.2008 die maschinelle Beatmung beendet und F.P. verstarb an einer hämorrhagischen Enzephalitis im Rahmen einer Adenovirensepsis.

6 Diskussion

6.1 Allgemeines

Stetig wachsen die Prognosen für Kinder und Jugendliche nach HSZT. Trotzdem steigern, neben dem Rezidivrisiko und der Grunderkrankung, auch die transplantationsassoziierten Komplikationen wie eine AdV-Infektion, die Morbidität und Mortalität nach HSZT immens. Bei manchen Erkrankungen übersteigt das Therapierisiko sogar das Rezidivrisiko der Grunderkrankung. AdV treten in der pädiatrischen Population endemisch auf und führen nach HSZT zu schweren Erkrankungen mit einer hohen Letalität bis zu 60% (Walls et al. 2003). Diese und vorangegangene Studien dienen dazu, besondere Aufmerksamkeit auf diese schwere Komplikation zu richten, Risikogruppen auszumachen und auch bei asymptomatischen Patienten ein Therapieregime zu etablieren, um die Prognose der Kinder nach HSZT weiter zu verbessern.

Vor Beginn der Diskussion der einzelnen Ergebnisse sollten vorerst die Limitationen der vorliegenden Arbeit beleuchtet werden. Obwohl es sich um retrospektive Studie über den Zeitraum von fast 12 Jahren handelt (01/1999 bis 10/2011), beschränkt sich die Zahl der an AdV erkrankten Patienten auf lediglich 28 pädiatrische Patienten, dies sind 10,7% der insgesamt 262 in diesem Zeitraum transplantierten Kinder. Sämtliche Daten und Parameter wurden gründlich aus teilweise digitalisierten und zahlreichen nicht digitalisierten Akten erhoben, auf deren Richtigkeit sich bei der Bearbeitung verlassen wurde. Das untersuchte Patientenkollektiv gestaltete sich sehr heterogen bezüglich Grunderkrankung, Transplantationsart, Konditionierungsregime, Begleiterkrankungen und Komedikation. Die durchgeführte Therapie erfolgte individuell und nicht immer nach einem standardisierten Schema. Letztendlich konnte jedoch die Heterogenität durch eine sorgfältige Aufteilung in einzelne Gruppen ausgeglichen werden, so dass es letztendlich möglich ist, die gewonnenen Schlussfolgerungen auf ein größeres Patientenkollektiv zu übertragen.

6.2 Adenovirusreaktivierungen und ihre Häufigkeiten

Häufigkeiten von Adenovirusnachweisen und Risikofaktoren einer AdV-Infektion waren Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. AdV kommen ubiquitär vor und können sowohl Epidemien, hauptsächlich im Winter, Frühling, Frühsommer, Endemien als auch sporadische Infektionen auslösen. Der Altersgipfel der AdV-Infektion liegt zwischen 6 Monaten und 5 Jahren. AdV sollen für bis zu 11% der oberen Atemwegserkrankungen, bis zu

10 % der Pharyngitiden, 9 % des Infektkrupps, 11 % der Bronchitiden, 10 % der Bronchiolitiden, 10 % der Pneumonien und bis zu 15 % der akuten Gastroenteritiden verantwortlich sein (Speer und Gahr 2009, Walls et al. 2003).

Die Inzidenzraten sind allerdings Schätzwerte, da in den meisten Fällen einer AdV-Infektion bei Immunkompetenten im Rahmen einer hausärztlichen Behandlung auf eine weiterführende Diagnostik verzichtet wird. Die Durchseuchung im Kindesalter liegt je nach Serotyp bei über 80 %, im Erwachsenenalter bei den Serotypen 1-7 bei praktisch 100% (Speer und Gahr 2009).

Dass die Erstinfektion mit AdV meist schon sehr zeitig im Kleinkindalter auftritt, deckt sich mit den Beobachtungen an dieser Patientengruppe. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Altersklasse und Reaktivierung gefunden werden, da die meisten Erstinfektionen in einem Zeitraum von 0-5 Jahren auftreten und so alle gewählten Altersklassen ein ähnliches Reaktivierungsrisiko aufweisen (Lion 2014). So erkrankten in der Altersklasse von 0-5 Jahre 11% an AdV, von 6-10 Jahren 8,9% und in der Altersklasse über 10 Jahre 12,5 % der Kinder.

Obwohl die meisten AdV-Infektionen akut und selbstlimitierend verlaufen, kann die asymptomatische Ausscheidung über den Gastrointestinaltrakt noch wochen- bis monatelang andauern und eine horizontale Übertragung begünstigen. Vielfältige Strategien der AdV ihr Genom zu verstecken, führen zu einer Persistenz im Wirt, welche möglicherweise lebenslang andauern kann (Kaslow et al. 2014). So konnten bei routinemäßig erfolgten Tonsillektomien bei 79% der Patienten hAdV-DNA aus den Lymphozyten des Tonsillengewebes extrahiert werden (Garnett et al. 2002, Garnett et al. 2009). Die genauen Signaltransduktionswege und Mechanismen sind Gegenstand aktueller Forschungen und noch weitestgehend unbekannt.

In Phasen von Immunsuppression kommt es zu einer Reaktivierung der AdV und zur symptomatischen Erkrankung. Reaktivierungen von AdV nach HSZT stellen eine lebensbedrohliche Komplikation dar. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie viele Patienten von einer Reaktivierung betroffen sind und ob eine Reaktivierung bei bestimmten Patienten wahrscheinlicher auftritt. Die Häufigkeitsangaben einer Adenovirusinfektion bei Kindern nach HSZT schwanken in der Fachliteratur erheblich und liegen zwischen 6% - 47% (Ison 2006, Baldwin et al. 2000, Bruno et al. 2003, Hale et al. 1999, Hoffman et al. 2001, Lion et al. 2003, Howard et al. 1999). In der hier untersuchten Patientengruppe wurden bei 28 von 262 Patienten AdV nachgewiesen, die Prävalenz liegt bei 10,7 %. Bei lediglich 4 von 28 Patienten lagen schon vor der Transplantation positive Adenovirusnachweise vor, so dass die Prävalenz von 1,52% vor der Transplantation auf 10,7 % nach der Transplantation gestiegen

ist. Auch dieser bedeutsame Anstieg spricht dafür, dass es sich bei den Infektionen um Reaktivierungen handelt und nicht um zufällige Neuinfektionen. Der Zeitpunkt der Reaktivierung wurde anhand des ersten positiven Adenovirusnachweises bestimmt und schwankt in unterschiedlichen Studien ebenfalls. Ein medianes Auftreten der Adenovirusinfektion von 18 Tagen (Baldwin et al. 2000), 41 Tagen (Howard et al. 1999) und 54 Tagen (Hale et al. 1999) wird berichtet. Generell ist zu sagen, dass die Reaktivierung mit AdV eher in den ersten 100 Tagen nach HSZT auftritt. In der vorliegenden Studie lag das mediane Auftreten des ersten Adenovirusnachweises bei 11 Tagen nach HSZT. Die Ergebnisse der Häufigkeitsanalyse decken sich weitestgehend mit den Beobachtungen anderer Studien und können somit als repräsentativ gewertet werden.

6.3 Letalität von Adenovirusinfektionen

Nach einer HSZT positiv auf AdV getestet zu werden, senkt die Überlebenszeit des Patienten signifikant ($p=0,06$). In der durchgeführten Kaplan-Meyer Überlebenszeitanalyse betrug das Überleben in der Gruppe der Patienten mit positivem Adenovirusnachweis 35,7% im Vergleich zu 60,7 % bei den Nichtinfizierten. Dass AdV einen gravierenden Einfluss auf Morbidität und Mortalität der transplantierten Patienten haben, ist inzwischen wissenschaftlicher Konsens. Dennoch ist es schwierig verwertbare Ergebnisse zu erheben, wenn die Unterscheidung der Gruppen in Infizierte und Nichtinfizierte erfolgt. Allen Patienten nach HSZT, ob infiziert oder nicht, ist eine schwere Grunderkrankung und eine extreme therapieassoziierte Morbidität gemein. Daher beeinflussen zahlreiche andere Faktoren das Risiko in beiden Gruppen zu versterben z.B. Transplantatversagen, GVHD, andere Infektionen oder ein Rezidiv. Dass unter diesem Aspekt dennoch ein signifikantes Ergebnis berechnet werden konnte, zeigt wie dramatisch sich eine AdV-Infektion auf die Betroffenen auswirken kann. Konkretere Zahlen liegen zur Letalität der disseminierten AdV-Infektion vor. Dabei finden sich in der aktuellen Studienlage Werte zwischen 60% (Hierholzer 1992) bis zu 82 % (Lion et al. 2003, Fuchs et al. 2007, George et al. 2012, Heim 2011). In der untersuchten Patientengruppe konnten ähnliche Ergebnisse berechnet werden. Trat die AdV-Infektion disseminiert auf, verstarben 50% der Patienten an den unmittelbaren Folgen der AdVE. Bei einem Adenovirusnachweis, der lokalisiert auftrat, verstarben 11,1 % der Patienten ($p = 0.023$). Ziel in der Betreuung von Patienten nach HSZT muss also sein, ein Auftreten der disseminierten AdV-Infektion zu verhindern und schon im lokalisierten Stadium die Infektion einzudämmen.

6.4 Risikofaktoren und deren Einfluss auf Reaktivierung und Letalität

Patienten mit positivem Adenovirusnachweis können in 3 Gruppen eingeteilt werden: subklinische Virämie, Virämie mit Symptomen und disseminierter Erkrankung (Lindemans et al. 2010). Dieses Bild zeigte sich auch im untersuchten Patientenkollektiv dieser Studie. Obwohl alle betroffenen Patienten einen positiven Adenovirusnachweis gemeinsam haben, sind die klinischen Verläufe von extremen Unterschieden geprägt - in einer Bandbreite von Beschwerdefreiheit bis hin zu disseminierter oft tödlicher AdV-Infektion. Anhand von empirischen klinischen Erfahrungen und der aktuellen Studienlage zum Thema wurden bestimmte Risikofaktoren ausgesucht und die Patienten diesen zugeordnet. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass neben dem Risiko eine Adenovirusinfektion zu erleiden vor allem das Risiko untersucht werden muss, an einer schweren disseminierten Form der Adenovirusinfektion zu erkranken. Zu erkennen, welche Faktoren entscheidend sind, ob eine Infektion komplikationslos oder akut lebensbedrohlich verläuft, wird auch in Zukunft eine Frage von immenser Bedeutung sein, denn bei dem ohnehin fragilen Gesundheitszustand der Transplantierten sind weder Übertherapie mit nebenwirkungsstarken Virostatika noch ein zu spätes Eingreifen bei positivem Adenovirusnachweis für die Gesamtsituation hilfreich. Damit diese individuellen Therapieentscheidungen evidenzbasiert getroffen werden und der Patient die für ihn bestmögliche Therapie erhält, müssen die Risikofaktoren für die Adenovirusreaktivierung und die disseminierte AdV-Infektion weiterhin intensiv erforscht werden.

6.4.1 Signifikante Risikofaktoren für Adenovirusinfektion

6.4.1.1 Transplantationsart

Die Transplantationsart (autolog versus allogene) stellt im hier untersuchten Patientenkollektiv einen signifikanten Risikofaktor dar. In der Gruppe der autolog Transplantierten erkrankten von 83 Patienten 4 an AdV (4,8%), in der Gruppe der allogene Transplantierten erkrankten von 179 Patienten 24 (13,4 %). Bei den 84 Kindern, die autolog transplantiert wurden, gab es keinen Todesfall, der durch AdV verursacht wurde. In der Patientengruppe der allogene Transplantierten verstarben 7 von 179 Kindern in Folge einer Adenovirusreaktivierung. Nicht bei allen Verstorbenen waren AdV die alleinige Todesursache, sondern ein bedeutender Faktor, der letztendlich zum Multiorganversagen und dadurch zum Tod führte. Dies stellt aufgrund der geringen Fallzahl von Todesfällen durch AdV einen Trend, aber kein signifikantes Ergebnis dar. Auch in der aktuellen Literatur wird die Transplantationsart als signifikanter Risikofaktor AdV-Infektion nach HSZT beschrieben (Howard et al. 1999, La Rosa et al. 2001). Bei Howard

et al. konnten bei 16% der allogenen Transplantierten und nur bei 3 % der autolog Transplantierten positive Adenovirusnachweise erbracht werden, mit einer Signifikanz von $p = 0,0001$ (Howard et al. 1999). Hintergrund dieses gesteigerten Risikos ist die erhöhte Immunsuppression bei einer allogenen HSZT und das Risiko der Übertragung durch das Transplantat. Runde et al. arbeiten den ADV-positiven Serostatus des Spenders als eigenständigen Risikofaktor heraus. In ihrer Studie wurden bei 50% der Patienten, deren Spender positive ADV-Antikörper verzeichneten, positive Adenovirusnachweise im Verlauf erbracht, wohingegen nur 12 % der Patienten mit Spendern ohne adenovirusspezifische Antikörper eine Adenovirusinfektion erlitten. Damit wird neben der Reaktivierung auch die Transmission durch das Transplantat als mögliche Infektionsquelle in den Focus gerückt (Runde et al. 2001). Bei allogenen HSZT muss demzufolge ein besonderes Augenmerk auf der Infektionsgefahr liegen, jedoch sollte auch bei autologen Infektionen gleichermaßen an eine mögliche Infektion oder Reaktivierung gedacht werden.

6.4.1.2 Schwere GVHD

Bei der Gruppeneinteilung in Patienten mit positivem Adenovirusnachweis und Patienten ohne nachgewiesene AdV konnte ein signifikanter Risikofaktor bezüglich der schweren GVHD erhoben werden. Patienten mit schwerer GVHD (Grad III und IV), bei der Haut, Darm und Leber schwerwiegend betroffen sind, haben ein signifikant höheres Risiko eine Adenovirusreaktivierung zu erleiden. Bei diesen Patienten liegt der Prozentwert der Reaktivierungen bei 33,3% im Vergleich zu Patienten ohne oder mit milder GVHD Grad I und II, bei denen der Anteil der positiven Adenovirusnachweise bei 11,6 % liegt ($p = 0,018$).

Andere Studien brachten ähnliche Ergebnisse. Olkinuora et al. berichten, dass Patienten mit akuter GVHD (Grad II-IV) häufiger frühe virale Reaktivierungen aufzeigen als solche ohne (75 % versus 42%, $p < 0,05$) und sehen als ursächlich u.a. die durch die schwere GVHD verzögerte Immunrekonstitution an (Olkinuora et al. 2011). Fowler et al. begründen den Zusammenhang zwischen schwerer GVHD und Adenovirusinfektion damit, dass die schwere GVHD Symptome der AdVE nachahmt und daher seltener entdeckt wird (Fowler et al. 2010). Dadurch kann sich eine lokale Infektion zu einer disseminierten Erkrankung entwickeln. Ein konsequentes Screening in der Posttransplantationsphase ermöglicht die Detektion und Behandlung dieser Patienten. Außerdem kann mit einer Untersuchung per Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)-Analyse die Zahl der T-Zellen bestimmt werden, was Rückschlüsse auf die aktuelle Immunrekonstitution des Patienten erlaubt, da besonders eine

verlangsamte T-Zell-Immunrekonstitution ein Risikofaktor für schwere GVHD, Infektion und Transplantatversagen darstellt (Oshrine et al. 2013).

Ebenso signifikant ist, dass eine AdV-Infektion besonders häufig letal verläuft, wenn sie an mindestens 4 unterschiedlichen Orten nachweisbar ist und somit als generalisiert zu bezeichnen ist ($p = 0,023$). Bei der Auswertung dieser schweren Adenovirusverläufe und der Patienten mit schwerer GVHD (Grad III und IV) konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Bei einer schweren GVHD hatten 20,0% auch eine schwere generalisierte AdV-Infektion, bei keiner GVHD oder einer milderen Form erkrankten nur 3,0 % der Patienten an einer generalisierten AdV-Infektion ($p = 0,002$).

6.4.2 Nicht signifikante Risikofaktoren für Adenoviren

6.4.2.1 Alter und Geschlecht

Das Alter der Kinder stellt in der vorliegenden Untersuchung keinen Risikofaktor für eine AdV-Infektion dar, da Reaktivierungen in allen 3 Altersgruppen in etwa gleich verteilt auftreten (0-5 Jahre: 11%, 6-10 Jahre 8,9%, >10 Jahre: 11,1%). Die Durchseuchung mit AdV erfolgt so früh im Kindesalter, dass in der gewählten unteren Altersgruppe von 0-5 die Wahrscheinlichkeit schon einmal Kontakt mit AdV aufgenommen zu haben bei nahezu 100 % liegt. Garnett, Erdmann et. al untersuchten Tonsillektomiepräparate im Rahmen von Routinetonsillektomien und analysierten das Auftreten von C-AdV-DNA. Das mediane Alter der eingeschlossenen Patienten betrug 4 Jahre und bei 79% der Kinder wurde hAdV-DNA im Tonsillengewebe festgestellt (Garnett et al. 2002). Außerdem sind AdV unabhängig vom Geschlecht ($p = 0,188$). Auch in der aktuellen Literatur ist es nichts Gegenteiliges dargestellt.

6.4.2.2 Stammzellquelle

Die verschiedenen Arten der allogenen HSZT, also die Unterteilung in Fremd- oder Geschwisterspender, zeigten kein signifikantes Ergebnis. In den beiden Untergruppen -Fremd- und Geschwisterspender- sind die Nachweisraten für AdV ähnlich hoch und genau wie in den Untergruppen - HLA- identische oder haploidentische Stammzellspende. Auch in der Literatur stellt dies keinen Risikofaktor dar und ist auch nicht zu erwarten (Howard et al. 1999).

6.4.2.3 CD34+-Selektion

Bei autologen Transplantationen werden die Stammzellen durch die Aufreinigung mittels Leukapherese nach CD34+Zellen selektioniert und damit von eventuell verbliebenen Tumorzellen getrennt. Bei allogenen Transplantationen dient diese Aufreinigung der Verminderung einer GVHD. Da hierbei, die für die Adenovirusabwehr wichtigen spezifischen

T-Zellen verloren gehen, untersuchte die vorliegende Arbeit die CD34+-Selektionierung der Transplantate als eigenständigen Risikofaktor, der sich nicht bestätigte. Die Infektionsrate in der Gruppe mit CD34+- Selektion betrug 12,0% und die in der Gruppe ohne CD34+-Selektion 10,6 %. Das Ergebnis ist nicht signifikant. Auch in der Literatur konnte bezüglich der CD34+-Selektionierung kein signifikantes Ergebnis erbracht werden (Lee et al. 2016). Da der Ansatz jedoch logisch erscheint, sind weitere Studien in diesem Bereich lohnenswert.

6.4.2.4 Konditionierungsregime

Zudem wurde untersucht, ob die Konditionierung im Vorfeld der HSZT einen Einfluss auf die Reaktivierung von AdV hat. Dazu wurde die Anwendung der verschiedenen Medikamente anhand von Kreuztabellen hinsichtlich dem Auftreten einer Adenovirusreaktivierung ausgewertet. Bei keiner der durchgeführten Statistiken konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden. Da alle Konditionierungsarten auf das Knochenmark myeloablativ wirken und die Immunabwehr des Patienten bis zum Anwachsen des Spendermarks nicht vorhanden bzw. extrem geschwächt ist, können vorhandene AdV reaktivieren. Die Medikamente sind unterschiedlich aggressiv, aber auch die mildereren Konditionierungsvarianten reichen aus, um eine Reaktivierung auszulösen. Allerdings gibt es erfolgversprechende Ansätze, die Konditionierung präemptiv, d.h. beim ersten positiven Adenovirusnachweis abzusetzen oder zu verringern. Dadurch und mittels einer frühen virustatischen Therapie ist es Kampmann et. Al gelungen, in 19 von 26 Fällen (81%) einen disseminierten Verlauf abzuwenden (Kampmann et al. 2005).

6.5 Einfluss der Therapie auf die Letalität

Die Therapieoptionen bei einer Adenovirusinfektion sind momentan als nicht suffizient einzuschätzen. Die Virustatika Cidofovir und Ribavirin sind nicht adenoviruspezifisch und zeigen in vivo begrenzte Wirksamkeit bei einer hohen Nebenwirkungsrate. Zusammen mit adenoviruspezifischen T-Zellen aus einer *donor lymphocyte infusion*, welche prophylaktisch oder interventionell verabreicht werden können, stellen sie jedoch momentan die einzig verfügbare Therapieoption der Adenovirusinfektion dar. Nach einer Infektion oder Reaktivierung hat das hAdV unter der Immunsuppression ideale Bedingungen sich im ganzen Körper auszubreiten und ist aufgrund seiner Eigenschaften - fehlender Immunabwehr und der meist schweren und ressourcenverbrauchenden Grunderkrankung - extrem schwer zu bekämpfen. Daher ist vor allem der Zeitpunkt des Therapiestarts entscheidend für den Verlauf. Bewährt hat sich die sog. präemptive Therapie, welche darauf basiert, sofort beim ersten positiven Nachweis des ADV mit einer virustatischen Therapie zu beginnen, um einen

schwerwiegenden Verlauf zu verhindern. Verläuft die Erkrankung erst disseminiert, gibt es keine zufriedenstellende Therapieoption, auch wenn in einigen Fällen von Erfolgen durch Cidofovir und oder der adoptiven Immuntherapie berichtet wird (Bordigoni et al. 2001, Legrand et al. 2001, Ljungman et al. 2003).

In der für diese Arbeit untersuchten Patientengruppe gab es große Unterschiede in der Auswahl des Therapieregimes. Die präemptive Therapie wurde nicht konsequent bei allen Patienten durchgeführt. Dadurch gibt es viele Patienten, die keine Therapie erhielten und die positiven Nachweise von alleine wieder negativ wurden. Diese Patienten führen dazu, dass in der Gesamtanalyse kein signifikanter Effekt einer Therapie erzielt werden konnte. Betrachtet man jedoch die disseminierten Erkrankungsverläufe, unterscheidet sich das Überleben je nach erfolgter Therapie mit oder ohne Cidofovir deutlich: 50% Überlebenswahrscheinlichkeit zum Ende des Untersuchungszeitraums vs. 0 % bei keiner oder anderer Therapie ($p = 0,01$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass auf diesem Gebiet noch viel Arbeit zu leisten ist, sowohl bei der Entwicklung neuer spezifischerer Medikamente, als auch bei der Ausarbeitung von Therapiestandards, um die Anzahl der disseminierten Verläufe zu reduzieren. Aktuell befindet sich eine Vorstufe von Cidofovir, das sogenannte CMX001 in der Phase III-Studie, welches bei guter Wirksamkeit keine nephrotoxischen Nebenwirkungen aufweist und damit bei positivem Ausgang, den betroffenen Patienten auch bei vorbestehenden Organschäden gegeben werden kann (Lanier et al. 2010). Wenn die neu entwickelten Medikamente mit weniger Nebenwirkungen bei gleicher Wirksamkeit auskämen, würde wahrscheinlich die Hemmschwelle sinken die Virustatika konsequent präemptiv einzusetzen.

7 Schlussfolgerung

Adenovirusinfektionen sind eine bedeutende und oft unterschätzte Komplikation nach allogener und auch autologer HSZT. Ein Ziel der Arbeit war es Risikofaktoren ausfindig zu machen, um die Zahl der infizierten Patienten zu reduzieren. Letztlich erwies sich nur eine schwere GVHD als signifikanter Risikofaktor einer Adenovirusinfektion. Adenovirusinfektionen sind meist Reaktivierungen einer früheren Infektion. Bei Immunsuppression können die Viren reaktivieren und sind entweder als symptomloser Virusnachweis sichtbar oder zeigen sich anhand typischer Symptome einer AdVE. Da alle Patienten vor der HSZT, eine das eigene Immunsystem zerstörende Therapie bekommen, sind alle Patienten fast gleichermaßen gefährdet, dass persistierende AdV reaktivieren. Dass es wenige signifikante Risikofaktoren gibt, soll für die mögliche Erkrankung bei jedem Kind nach HSZT sensibilisieren und zu wöchentlichen Screenings in der Posttransplantationsphase aufrufen. Diese Screenings wurden in der untersuchten Patientengruppe mittels qualitativer PCR, vom Hot-Start-Typ sowie des Enzymimmunassays Ridascreen durchgeführt. Bei einem positiven Nachweis sollte eine präemptive Therapie eingeleitet werden, bevor sich die Infektion zu einer generalisierten oder disseminierten AdV-Infektion ausbreitet, welche eine signifikant erhöhte Letalität aufweist. Empfehlenswert ist das Monitoring der AdV-Infektion mittels quantitativer PCR, da die quantifizierten Kopien im direkten Verhältnis zur Schwere der Organpathologie stehen. Somit kann die Therapie je nach quantifizierten Kopien intensiviert und das Risiko einer generalisierten AdV-Infektion schneller abgeschätzt werden. Ein wirksames Virustatikum zur Behandlung der AdV-Infektion ist Cidofovir. In der Phase der disseminierten Erkrankung zeigten Patienten mit einer Therapie mit Cidofovir die besten Überlebenschancen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Adenovirusreaktivierung im Setting der HSZT zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt wird. Jeder Patient hat ein Risiko eine AdV-Infektion zu bekommen und daran zu versterben. Die Therapie muss schnell erfolgen und auch aufwändigere Therapieverfahren wie die Gabe von adenovirusspezifischen Spenderlymphozyten sollten zeitig in Erwägung gezogen werden, da bisher in der disseminierten Infektionsphase keine sicher wirksame Therapie zur Verfügung steht.

8 Literaturverzeichnis

Al-Harthi, L.; Marchetti, G.; Steffens, C. M.; Poulin, J.; Sekaly, R.; Landay, A. (2000): Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). In: *Journal of immunological methods* 237 (1-2), S. 187–197.

Apperley, J. F.; Jones, L.; Hale, G.; Waldmann, H.; Hows, J.; Rombos, Y. et al. (1986): Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. In: *Bone marrow transplantation* 1 (1), S. 53–66.

Ascioglu, S.; Rex, J. H.; Pauw, B. de; Bennett, J. E.; Bille, J.; Crokaert, F. et al. (2002): Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 34 (1), S. 7–14.

Bacigalupo, A.; Lamparelli, T.; Gualandi, F.; Bregante, S.; Raiola, A. M.; Di Grazia, C. et al. (2002): Prophylactic antithymocyte globulin reduces the risk of chronic graft-versus-host disease in alternative-donor bone marrow transplants. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 8 (12), S. 656–661.

Baldwin, A.; Kingman, H.; Darville, M.; Foot, A. B. M.; Grier, D.; Cornish, J. M. et al. (2000): Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. In: *Bone Marrow Transplant* 26 (12), S. 1333–1338.

Ball, L. M.; Egeler, R. M. (2008): Acute GvHD: pathogenesis and classification. In: *Bone Marrow Transplant* 41, S. S58-S64.

Bartsch, Hans Helge; Mertelsmann, R. (Hg.) (1996): Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation. Medizinische Probleme der Posttransplantationsphase und Rehabilitationsstrategien. Symposium "Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation". Basel: KARGER (Tumorthherapie und Rehabilitation, 1).

Bender, J. G.; To, L. B.; Williams, S.; Schwartzberg, L. S. (1992): Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. In: *Journal of hematotherapy* 1 (4), S. 329–341.

Billingham, R. E.; Brent, L. (1959): Quantitative Studies on Tissue Transplantation Immunity. IV. Induction of Tolerance in Newborn Mice and Studies on the Phenomenon of Runt Disease. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 242 (694), S. 439–477.

Bil-Lula, Iwona; Ussowicz, Marek; Rybka, Blanka; Wendycz-Domalewska, Danuta; Ryczan, Renata; Gorczyńska, Ewa et al. (2010): PCR diagnostics and monitoring of adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. In: *Arch Virol* 155 (12), S. 2007–2015.

Blume, Karl G.; Weissman, Irving L. (2012): E. Donnall Thomas (1920-2012). In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (51), S. 20777–20778.

Bönig, H.; Heiden, M.; Schüttrumpf, J.; Müller, M. M.; Seifried, E. (2011): Potenzial hämatopoetischer Stammzellen als Ausgangsmaterial für Arzneimittel für neuartige Therapien. In: *Bundesgesundheitsbl.* 54 (7), S. 791–796.

Bordigoni, P.; Carret, A. S.; Venard, V.; Witz, F.; Le Faou, A. (2001): Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 (9), S. 1290–1297.

Bornhauser, Martin; Kiehl, Michael; Siegert, Wolfgang; Schetelig, Johannes; Hertenstein, Bernd; Martin, Hans et al. (2001): Dose-reduced conditioning for allografting in 44 patients with chronic myeloid leukaemia. A retrospective analysis. In: *Br J Haematol* 115 (1), S. 119–124.

Bornhauser, Martin; Platzbecker, Uwe; Theuser, Catrin; Holig, K.; Ehninger, Gerhard (2002): CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells from unrelated donors for allografting of adult patients: high risk of graft failure, infection and relapse despite donor lymphocyte add-back. In: *British Journal of Haematology* 118 (4), S. 1095–1103.

Bruno, B.; Gooley, T.; Hackman, R. C.; Davis, C.; Corey, L.; Boeckh, M. (2003): Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 9 (5), S. 341–352.

Chao, N. J.; Snyder, D. S.; Jain, M.; Wong, R. M.; Niland, J. C.; Negrin, R. S. et al. (2000): Equivalence of 2 effective graft-versus-host disease prophylaxis regimens: results of a

prospective double-blind randomized trial. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 6 (3), S. 254–261.

Chatziandreou, Ilenia; Gilmour, Kimberly C.; McNicol, Anne-Marie; Costabile, Maurizio; Sinclair, Joanna; Cubitt, David et al. (2007): Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. In: *British Journal of Haematology* 136 (1), S. 117–126.

Chirgwin, John M.; Przybyla, Alan E.; MacDonald, Raymond J.; Rutter, William J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. In: *Biochemistry* 18 (24), S. 5294–5299.

Couri, Carlos E. B.; Oliveira, Maria C. B.; Stracieri, Ana B P L; Moraes, Daniela A.; Pieroni, Fabiano; Barros, George M. N. et al. (2009): C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. In: *JAMA* 301 (15), S. 1573–1579.

Cutler, Corey; Antin, Joseph H. (2001): Peripheral Blood Stem Cells for Allogeneic Transplantation: A Review. In: *Stem Cells* 19 (2), S. 108–117.

Davison, Andrew J.; Benko, Maria; Harrach, Balazs (2003): Genetic content and evolution of adenoviruses. In: *The Journal of general virology* 84 (11), S. 2895–2908.

Deeg, H.Joachim (1994): Graft-versus-host disease and the development of late complications. In: *Transfusion Science* 15 (3), S. 243–254.

Diaz, M. A.; Vicent, M. G.; Garcia-Sanchez, F.; Vicario, J. L.; Madero, L. (2000): Long-term hematopoietic engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in pediatric patients: effect of the CD34+ cell dose. In: *Vox sanguinis* 79 (3), S. 145–150.

Dickinson, Anne M.; Middleton, Peter G.; Rocha, Vanderson; Gluckman, Eliane; Holler, Ernst (2004): Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. In: *British Journal of Haematology* 127 (5), S. 479–490.

Ebner, K.; Rauch, M.; Preuner, S.; Lion, T. (2006): Typing of Human Adenoviruses in Specimens from Immunosuppressed Patients by PCR-Fragment Length Analysis and Real-Time Quantitative PCR. In: *Journal of Clinical Microbiology* 44 (8), S. 2808–2815.

Echavarria, Marcela (2008): Adenoviruses in immunocompromised hosts. In: *Clinical microbiology reviews* 21 (4), S. 704–715.

Einsele, H.; Hebart, H. (2001): Therapierelevante Parameter der immunologischen Rekonstitution nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation. In: H.H Bartsch, J.

Finke und A. Mumm (Hg.): Hämatopoetische Stammzelltransplantation. Basel: KARGER, S. 58–67.

Ferrara, J. L.; Deeg, H. J. (1991): Graft-versus-host disease. In: *The New England journal of medicine* 324 (10), S. 667–674.

Ford, C. E.; Hamerton, J. L.; Barnes, D. W.; Loutit, J. F. (1956): Cytological identification of radiation-chimaeras. In: *Nature* 177 (4506), S. 452–454.

Fowler, Cedar J.; Dunlap, Jennifer; Troyer, Darcy; Stenzel, Peter; Epner, Elliot; Maziarz, Richard T. (2010): Life-threatening adenovirus infections in the setting of the immunocompromised allogeneic stem cell transplant patients. In: *Advances in Hematology* 2010, S. 1–6.

Fuchs, Georg; Schlegel, Hans G.; Eitinger, Thomas (2007): Allgemeine Mikrobiologie. 53 Tabellen. 8., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Furlong, Terry; Leisenring, Wendy; Storb, Rainer; Anasetti, Claudio; Appelbaum, Frederick R.; Carpenter, Paul A. et al. (2002): Psoralen and ultraviolet A irradiation (PUVA) as therapy for steroid-resistant cutaneous acute graft-versus-host disease. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 8 (4), S. 206–212.

Gahrton, Gosta; Iacobelli, Simona; Bandini, Giuseppe; Bjorkstrand, Bo; Corradini, Paolo; Crawley, Charles et al. (2007): Peripheral blood or bone marrow cells in reduced-intensity or myeloablative conditioning allogeneic HLA identical sibling donor transplantation for multiple myeloma. In: *Haematologica* 92 (11), S. 1513–1518.

Ganzenmueller, Tina; Buchholz, Stefanie; Harste, Gabi; Dammann, Elke; Trenchel, Rudolf; Heim, Albert (2011): High lethality of human adenovirus disease in adult allogeneic stem cell transplant recipients with high adenoviral blood load. In: *Journal of Clinical Virology* 52 (1), S. 55–59.

Garnett, C. T.; Erdman, D.; Xu, W.; Gooding, Linda R. (2002): Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. In: *Journal of virology* 76 (21), S. 10608–10616.

Garnett, C. T.; Talekar, G.; Mahr, J. A.; Huang, W.; Zhang, Y.; Ornelles, D. A.; Gooding, L. R. (2009): Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. In: *Journal of virology* 83 (6), S. 2417–2428.

Gatti, R. A.; Meuwissen, H. J.; Allen, H. D.; Hong, R.; Good, R. A. (1968): Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. In: *Lancet* 2 (7583), S. 1366–1369.

George, Diane; El-Mallawany, Nader Kim; Jin, Zhezhen; Geyer, Mark; Della-Latta, Phyllis; Satwani, Prakash et al. (2012): Adenovirus infection in paediatric allogeneic stem cell transplantation recipients is a major independent factor for significantly increasing the risk of treatment related mortality. In: *British Journal of Haematology* 156 (1), S. 99–108.

Glucksberg, H.; Storb, R.; Fefer, A.; Buckner, C. D.; Neiman, P. E.; Clift, R. A. et al. (1974): Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. In: *Transplantation* 18 (4), S. 295–304.

Goulmy, E.; Schipper, R.; Pool, J.; Blokland, E.; Falkenburg, J. H.; Vossen, J. et al. (1996): Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. In: *The New England journal of medicine* 334 (5), S. 281–285.

Gratwohl, A.; Brand, R.; Frassoni, F.; Rocha, V.; Niederwieser, D.; Reusser, P. et al. (2005): Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. In: *Bone Marrow Transplant* 36 (9), S. 757–769.

Gratwohl, Alois; Baldomero, Helen; Aljurf, Mahmoud; Pasquini, Marcelo C.; Bouzas, Luis Fernando; Yoshimi, Ayami et al. (2010): Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. In: *JAMA* 303 (16), S. 1617–1624.

Grauer, O.; Wolff, D.; Bertz, H.; Greinix, H.; Kuhl, J.-S.; Lawitschka, A. et al. (2010): Neurological manifestations of chronic graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: report from the Consensus Conference on Clinical Practice in chronic graft-versus-host disease. In: *Brain* 133 (10), S. 2852–2865.

Gudiol, C.; Garcia-Vidal, C.; Arnan, M.; Sánchez-Ortega, I.; Patiño, B.; Duarte, R.; Carratalà, J. (2014): Etiology, clinical features and outcomes of pre-engraftment and post-engraftment bloodstream infection in hematopoietic SCT recipients. In: *Bone Marrow Transplant* 49 (6), S. 824–830.

Haas, Rainer; Kronenwett, Ralf (2005): Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle. Grundlagen, Indikationen, therapeutischer Nutzen ; mit 2 Tabellen. Köln: Deutscher Ärzte-Verl.

Hale, G.; Cobbald, S.; Waldmann, H. (1988): T cell depletion with CAMPATH-1 in allogeneic bone marrow transplantation. In: *Transplantation* 45 (4), S. 753–759.

Hale, G. A.; Heslop, H. E.; Krance, R. A.; Brenner, M. A.; Jayawardene, D.; Srivastava, D. K.; Patrick, C. C. (1999): Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. In: *Bone marrow transplantation* 23 (3), S. 277–282.

Hara, J.; Okamoto, S.; Minekawa, Y.; Yamazaki, K.; Kase, T. (1990): Survival and disinfection of adenovirus type 19 and enterovirus 70 in ophthalmic practice. In: *Japanese journal of ophthalmology* 34 (4), S. 421–427.

Heim, Albert (2011): Advances in the management of disseminated adenovirus disease in stem cell transplant recipients: impact of adenovirus load (DNAemia) testing. In: *Expert Review of Anti-infective Therapy* 9 (11), S. 943–945.

Heim, Albert; Ebnet, Carmen; Harste, Gabi; Pring-åkerblom, Patricia (2003): Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. In: *Journal of Medical Virology* 70.

Hierholzer, J. C. (1992): Adenoviruses in the immunocompromised host. In: *Clin. Microbiol. Rev.* 5 (3), S. 262–274.

Hoffman, J. A.; Shah, A. J.; La Ross; Kapoor, N. (2001): Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 7 (7), S. 388–394.

Howard, Dianna S.; Phillips, Gordon L.; Reece, Donna E.; Munn, Rita K.; Henslee-Downey, Jean; Pittard, Melissa et al. (1999): Adenovirus Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. In: *Clin Infect Dis.* 29 (6), S. 1494–1501.

Ison, Michael G. (2006): Adenovirus Infections in Transplant Recipients. In: *Clinical Infectious Diseases* 43 (3), S. 331–339.

Jansohn, Monika (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; Imprint: Spektrum Akademischer Verlag.

Jeulin, H.; Salmon, A.; Bordigoni, P.; Venard, V. (2011): Diagnostic value of quantitative PCR for adenovirus detection in stool samples as compared with antigen detection and cell culture

in haematopoietic stem cell transplant recipients. In: *Clinical Microbiology and Infection* 17 (11), S. 1674–1680.

Kampmann, B.; Cubitt, D.; Walls, T.; Naik, P.; Depala, M.; Samarasinghe, S. et al. (2005): Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. In: *British Journal of Haematology* 130 (4), S. 595–603.

Kaslow, Richard A.; Stanberry, Lawrence R.; Le Duc, James W. (Hg.) (2014): *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*. 5th ed. 2014. Boston, MA, s.l.: Springer US. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8>.

Kolb, Hans-Jochem (2008): Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. In: *Blood* 112 (12), S. 4371–4383.

Kulozik, Andreas E. (2000): *Molekulare Medizin. Grundlagen - Pathomechanismen - Klinik*. Berlin [u.a.]: de Gruyter.

La Rosa, A. M.; Champlin, R. E.; Mirza, N.; Gajewski, J.; Giralt, S.; Rolston, K. V. et al. (2001): Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 (6), S. 871–876.

Lanier, Randall; Trost, Lawrence; Tippin, Tim; Lampert, Bernhard; Robertson, Alice; Foster, Scott et al. (2010): Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections. In: *Viruses* 2 (12), S. 2740–2762.

Lark, Rebecca L.; McNeil, Shelly A.; VanderHyde, Kristi; Noorani, Zehra; Uberti, Joseph; Chenoweth, Carol (2001): Risk Factors for Anaerobic Bloodstream Infections in Bone Marrow Transplant Recipients. In: *CLIN INFECT DIS* 33 (3), S. 338–343.

Lee, Yeon Joo; Huang, Yao-Ting; Kim, Seong Jin; Maloy, Molly; Tamari, Roni; Giralt, Sergio A. et al. (2016): Adenovirus Viremia in Adult CD34(+) Selected Hematopoietic Cell Transplant Recipients: Low Incidence and High Clinical Impact. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 22 (1), S. 174–178.

Legrand, F.; Berrebi, D.; Houhou, N.; Freymuth, F.; Faye, A.; Duval, M. et al. (2001): Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. In: *Bone marrow transplantation* 27 (6), S. 621–626.

Lindemans, Caroline A.; Leen, Ann M.; Boelens, Jaap Jan (2010): How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. In: *Blood* 116 (25), S. 5476–5485.

Lion, T.; Baumgartinger, R.; Watzinger, F.; Matthes-Martin, S.; Suda, M.; Preuner, S. et al. (2003): Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. In: *Blood* 102 (3), S. 1114–1120.

Lion, Thomas (2014): Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. In: *Clinical microbiology reviews* 27 (3), S. 441–462.

Ljunggren, Hans-Gustaf; Kärre, Klas (1990): In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. In: *Immunology Today* 11, S. 237–244.

Ljungman, P.; Ribaud, P.; Eyrich, M.; Matthes-Martin, S.; Einsele, H.; Bleakley, M. et al. (2003): Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. In: *Bone marrow transplantation* 31 (6), S. 481–486.

Longo, Mary C.; Berninger, Mark S.; Hartley, James L. (1990): Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. In: *Gene* 93 (1), S. 125–128.

Lorenz, E.; Uphoff, D.; Reid, T. R.; Shelton, E. (1951): Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 12 (1), S. 197–201.

Main, J. M.; Prehn, R. T. (1955): Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. In: *J Natl Cancer Inst* 15 (4), S. 1023–1029.

Mannick, J. A.; Lochte, H. L. Jr.; Ashley, C. A.; Thomas, E. D.; Ferrebee, J. W. (1959): A functioning kidney homotransplant in the dog. In: *Surgery* 46, S. 821–828.

Mathe, G.; Amiel, J. L.; Schwarzenberg, L.; Cattani, A.; Schneider, M. (1965): Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. In: *Cancer research* 25 (9), S. 1525–1531.

Mitra, D. K.; Singh, H. P.; Singh, M.; Alwadi, A.; Kochupillai, V.; Raina, V. et al. (2002): Reconstitution of naive T cells and type 1 function after autologous peripheral stem cell transplantation: impact on the relapse of original cancer. In: *Transplantation* 73 (8), S. 1336–1339.

Moscardo, Federico; Romero, Samuel; Sanz, Jaime; Sanz, Miguel A.; Montesinos, Pau; Lorenzo, Ignacio et al. (2014): T cell-depleted related HLA-mismatched peripheral blood stem

cell transplantation as salvage therapy for graft failure after single unit unrelated donor umbilical cord blood transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20 (7), S. 1060–1063.

Nash, R. A.; Antin, J. H.; Karanes, C.; Fay, J. W.; Avalos, B. R.; Yeager, A. M. et al. (2000): Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. In: *Blood* 96 (6), S. 2062–2068.

Olkinuora, H.; Willebrand, E. von; Kantele, J. M.; Vainio, O.; Talvensaari, K.; Saarinen-Pihkala, U. et al. (2011): The Impact of Early Viral Infections and Graft-Versus-Host Disease on Immune Reconstitution Following Paediatric Stem Cell Transplantation. In: *Scandinavian Journal of Immunology* 73.

Oshrine, Benjamin R.; Li, Yimei; Teachey, David T.; Heimall, Jennifer; Barrett, David M.; Bunin, Nancy (2013): Immunologic recovery in children after alternative donor allogeneic transplantation for hematologic malignancies: comparison of recipients of partially T cell-depleted peripheral blood stem cells and umbilical cord blood. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 19 (11), S. 1581–1589.

Oste, C. (1988): Polymerase chain reaction. In: *BioTechniques* 6 (2), S. 162–167.

Ottinger, H.; Grosse-Wilde, M.; Schmitz, A.; Grosse-Wilde, H. (1994): Immunogenetic marrow donor search for 1012 patients: a retrospective analysis of strategies, outcome and costs. In: *Bone Marrow Transplant* 14 Suppl 4, S. 8.

Papayannopoulou, T.; Scadden, D. T. (2008): Stem-cell ecology and stem cells in motion. In: *Blood* 111 (8), S. 3923–3930.

Patel, P.; Tuke, P.; Tettmar, K.; Cloutman-Green, E.; Hartley, J.; Klein, N. et al. (2015): No evidence of transfusion transmission of Adenovirus and Epstein-Barr virus infections in paediatric recipients post-bone marrow transplant. In: *Vox sanguinis* 109 (1), S. 95–97.

Putz, C. (2009): Quantitativer Nachweis von Humanen Adenoviren mittels LightCycler-Technologie. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.

R-Biopharm AG (2005): Produktinformation RIDASCREEN® Adenovirus.

Ringden, Olle; Barrett, A. John; Zhang, Mei-Jie; Loberiza, Fausto R.; Bolwell, Brian J.; Cairo, Mitchell S. et al. (2003): Decreased treatment failure in recipients of HLA-identical bone

marrow or peripheral blood stem cell transplants with high CD34 cell doses. In: *Br J Haematol* 121 (6), S. 874–885.

Ringdén, O.; Labopin, M.; Ciceri, F.; Velardi, A.; Bacigalupo, A.; Arcese, W. et al. (2015): Is there a stronger graft-versus-leukemia effect using HLA-haploidentical donors compared with HLA-identical siblings? In: *Leukemia*.

Rink, Lothar; Kruse, Andrea; Haase, Hajo (2012): *Immunologie für Einsteiger*. 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum.

Robinson, J. (2003): IMGT/HLA and IMGT/MHC. Sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. In: *Nucleic Acids Research* 31 (1), S. 311–314.

Rosenmayr, A.; Pointner-Prager, M.; Mitterschiffthaler, A.; Bozic, L.; Pelzmann, B.; Tüchler, H. et al. (2011): What are a patient's current chances of finding a matched unrelated donor? Twenty years' central search experience in a small country. In: *Bone Marrow Transplant* 47 (2), S. 172–180.

Runde, V.; Ross, S.; Trenchel, R.; Lagemann, E.; Basu, O.; Renzing-Kohler, K. et al. (2001): Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. In: *Bone marrow transplantation* 28 (1), S. 51–57.

Russell, W. C. (2000): Update on adenovirus and its vectors. In: *The Journal of general virology* 81 (Pt 11), S. 2573–2604.

Schwartzberg, L. S.; Birch, R.; Hazelton, B.; Tauer, K. W.; Lee, P., JR; Altemose, R. et al. (1992): Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. In: *Journal of hematology* 1 (4), S. 317–327.

Speer, Christian; Gahr, Manfred (2009): *Pädiatrie*. 3., vollst. neu bearb. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin-Verl.

Sutherland, J. S.; Spyroglou, L.; Muirhead, J. L.; Heng, T. S.; Prieto-Hinojosa, A.; Prince, H. M. et al. (2008): Enhanced Immune System Regeneration in Humans Following Allogeneic or Autologous Hemopoietic Stem Cell Transplantation by Temporary Sex Steroid Blockade. In: *Clinical Cancer Research* 14 (4), S. 1138–1149.

Taniguchi, Kyoko; Yoshihara, Satoshi; Tamaki, Hiroya; Fujimoto, Tsuguto; Ikegame, Kazuhiro; Kaida, Katsuji et al. (2012): Incidence and treatment strategy for disseminated

adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. In: *Ann Hematol* 91 (8), S. 1305–1312.

Thiele, D. (1991): The "polymerase chain reaction" (PCR) and its possible applications. In: *Immunität und Infektion* 19 (5), S. 138–142.

Thomas, E. D.; Lochte, H. L. Jr.; Cannon, J. H.; Sahler, O. D.; Ferrebee, J. W. (1959): Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. In: *J Clin Invest* 38, S. 1709–1716.

Thomas, E. Donnall; Blume, Karl G. (1999): Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 5 (6), S. 341–346.

To, L. B.; Haylock, D. N.; Kimber, R. J.; Juttner, C. A. (1984): High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation. In: *Br J Haematol* 58 (3), S. 399–410.

Tomblyn, Marcie; Chiller, Tom; Einsele, Hermann; Gress, Ronald; Sepkowitz, Kent; Storek, Jan et al. (2009): Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 15 (10), S. 1143–1238.

Uphoff, D. E. (1957): Genetic factors influencing irradiation protection by bone marrow. I. The F1 hybrid effect. In: *J Natl Cancer Inst* 19 (1), S. 123–130.

Uphoff, D. E. (1958): Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 99 (3), S. 651–653.

van ROOD, J. J.; Eernisse, J. G.; van Leeuwen, A. (1958): Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. In: *Nature* 181 (4625), S. 1735–1736.

Voshaar, Thomas; Köhler, Dieter; Schönhofer, Bernd (2009): Pneumologie. 1. Auflage. [s.l.]: Thieme.

Walls, Tony; Shankar, A. G.; Shingadia, Delane (2003): Adenovirus. An increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. In: *The Lancet Infectious Diseases* 3 (2), S. 79–86.

Yaghobi, R.; Langari, M. J.; Ramzi, M.; Geramizadeh, B.; Zakerinia, M.; Khojasteh, H. N.; Dehghani, M. (2011): Molecular Impact and Inducible Factors Associated With Adenovirus

Infection in Hematopoietic Skin Cell Transplant Patients. In: *Transplantation Proceedings* 43 (2), S. 644–646.

Zittoun, R. A.; Mandelli, F.; Willemze, R.; Witte, T. de; Labar, B.; Resegotti, L. et al. (1995): Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. In: *The New England journal of medicine* 332 (4), S. 217–223.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Schweregradeinteilung der akuten GVHD nach Organen
Tab. 2:	Gesamtschweregrad der akuten GVHD
Tab. 3:	Patientencharakteristik
Tab. 4:	Medikation zur Darmdekontamination
Tab. 5:	häufige Konditionierungen der Patienten
Tab. 6:	Primer und Sequenzen der hAdV-PCR
Tab. 7:	PCR-Zyklen
Tab. 8:	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen der qualitativen PCR
Tab. 9:	Packungsinhalt Ridascreen® hAdV Kit
Tab. 10:	Nachweisorte von Symptome einer AdV-Infektion
Tab. 11:	Kreuztabelle mit den Variablen AdV in > 3 Materialien und Letalität
Tab. 12:	Kreuztabelle für die Variablen Altersklasse (klassiert) und AdV
Tab. 13:	Kreuztabelle für die Variablen Geschlecht und AdV
Tab. 14:	Kreuztabelle mit den Variablen Transplantationsart und AdV
Tab. 15:	Zusammenhang zwischen Transplantationsart und Tod durch AdV
Tab. 16:	Kreuztabelle mit den Variablen Art des Spenders (Geschwister- oder Fremdspender) und AdV
Tab. 17:	Kreuztabelle mit den Variablen Art des Spenders (HLA- identisch oder nicht) und AdV
Tab. 18:	CD-34-Selektion und AdV
Tab. 19:	Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung mit Busulfan und AdV
Tab. 20:	Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung mit Cyclophosphamid und AdV
Tab. 21:	Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung durch Bestrahlung und AdV
Tab. 22:	Kreuztabelle mit den Variablen Konditionierung mit ATG und AdV
Tab. 23:	Kreuztabelle mit den Variablen GVHD und AdV
Tab. 24:	Kreuztabelle mit den Variablen schwere GVHD und AdV
Tab. 25:	Kreuztabelle mit den Variablen schwere GVHD und generalisierte AdV-Infektion

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Grunderkrankung der Patienten
- Abb. 2: Stammzellquelle für HSZT
- Abb. 3: Remissionsstatus der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation
- Abb. 4: GVHD-Prophylaxe
- Abb. 5: Anzahl der Patienten mit AdV-Infektion
- Abb. 6: letale Ausgänge von Patienten mit AdV
- Abb. 7: Überleben bei Patienten mit und ohne AdV
- Abb. 8: AdV-Nachweis im Blut
- Abb. 9: AdV-Nachweis im Urin
- Abb. 10: AdV-Nachweis im Stuhl durch ELISA
- Abb. 11: AdV-Nachweis im Stuhl durch PCR
- Abb. 12: generalisierte AdV-Infektion und Letalität
- Abb. 13: Überleben bei AdV in > 3 Materialien
- Abb. 14: Anzahl der Patienten mit AdV in klassierten Altersgruppen
- Abb. 15: Patienten mit AdV aufgeteilt nach Geschlecht
- Abb. 16: Patienten mit AdV aufgeteilt nach Transplantationsart
- Abb. 17: letale AdV-Infektion aufgeteilt nach Transplantationsart
- Abb. 18: Patienten mit AdV aufgeteilt nach Art des Spenders
- Abb. 19: CD-34-Selektion und AdV
- Abb. 20: Zusammenhang schwere GVHD und AdV
- Abb. 21: Zusammenhang schwere GVHD und generalisierte AdV-Infektion
- Abb. 22: Reihenfolge AdV und GVHD
- Abb. 23: Überleben bei Patienten mit generalisierter AdV je Cidofovirtherapie

9.3 Lebenslauf

Thomas, Elisa

geb. am 06.08.1990

in Halle/ Saale

verheiratet

09/1997 - 07/2001

Grundschule „Ulrich-von-Hutten“, Halle

09/2001 - 07/2009

Landesgymnasium Latina A.H.Francke

19.06.2009

Abitur

10/2009 - 09/2011

Vorklinische Ausbildung an der FSU Jena

28.09.2011

1. Staatsexamen

ab 10/2011

Klinische Ausbildung an der FSU Jena

10/2014

2. Staatsexamen

02/2015

Geburt von Jakob Thomas

05/2016 – 04/2017

Praktisches Jahr

06/2017

3. Staatsexamen

seit 10/2017

Assistenzärztin Fachbereich Gefäßchirurgie,
Diakonissenkrankenhaus Leipzig

9.4 Danksagung

Auf diesem Weg möchte ich meinen tiefsten Dank an die Menschen aussprechen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ganz besonderen Dank gilt Prof. Gruhn. Er hat mir dieses hochinteressante Thema zur Verfügung gestellt und mich in den Jahren der Bearbeitung immer wieder unterstützt und motiviert. Auch bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Lehmann, der mich in statistischen Fragen unterstützt hat. Mit Hilfe von Frau Dr. Egerer konnte ich die Methoden verstehen und praktisch anwenden und Herr Dr. Häfer hat mir sehr lehrreich die Facs-Analyse und Durchflusszytologie erklärt. Ich danke meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat und ohne die ich, dieses Ziel nicht erreicht hätte und ganz besonders meinem Mann, der mir eine große moralische Unterstützung war und immer für mich da ist.

9.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. B. Gruhn (Leiter Sektion Hämatologie/Onkologie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Dr. T. Lehmann (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation)
- Dr. Renate Egerer (Institut für medizinische Mikrobiologie, Abteilung Virologie, Jena)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Leipzig, den 22.04.17

Elisa Thomas